

Zum Mechanismus der Acetessigsäure-
und Cholesterinbildung
bei experimenteller Ketose

Georg Löffler

=
1961

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik München

Direktor: Professor Dr. Dr. G. B o d e c h t e l

ZUM MECHANISMUS DER ACETESSIGSÄURE- UND
CHOLESTERINBILDUNG BEI EXPERIMENTELLER KETOSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Georg Löffler
aus München

1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. O. Wieland
Coreferent: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Eyer
Tag der mündlichen Prüfung: 11. 4. 1961



INHALT

	Seite
<u>Einleitung</u>	
<u>Ergebnisse:</u>	3
Bestimmung des Oxalessigsäuregehaltes der Leber	3
Bestimmung des Acetessigsäure synthetisierenden Enzymsystems und des HMG-CoA-spaltenden Enzyms	3
Bestimmung des Mevalonsäuregehaltes der Leber	10
Bestimmung der HMG-CoA Reduktase der Leber	10
<u>Diskussion</u>	13
<u>Experimenteller Teil</u>	
Tiere und Diabeteserzeugung	23
Organentnahme und Verarbeitung	25
Bestimmung von Acetacetat und Oxalacetat	26
Bestimmung von Mevalonat	32
Bestimmung des Acetessigsäure synthetisierenden Enzymsystems	32
Bestimmung der HMG-CoA Reduktase	41
Statistische Berechnung	49
<u>Zusammenfassung</u>	50
<u>Literatur</u>	53

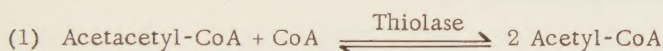


Digitized by the Internet Archive
in 2026

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Acetyl-CoA	=	Acetyl-Coenzym A
ADP	=	Adenosin-5'-diphosphat
ÄDTA	=	Äthylendiamintetraacetat, Kaliumsalz
ASES	=	Acetessigsäure synthetisierendes Enzymsystem
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
BTS	=	Brenztraubensäure
CoA, CoA-SH	=	Coenzym A
DPN	=	Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	=	Diphosphopyridinnucleotid, reduzierte Form
EE	=	Enzymeinheiten
G-6-P	=	Glucose-6-phosphat
G-6-PDH	=	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GOT	=	Glutaminsäure-Oxallessigsäure-Transaminase
GSH	=	Gluathion, reduziert
HMG-CoA	=	β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA
LDH	=	Laktatdehydrogenase
MDH	=	Malatdehydrogenase
MV-Kinase	=	Mevalonsäurekinase
MVS	=	Mevalonsäure
μ M, μ Mol	=	Mikromol = 10^{-6} Mol
nM, nMol	=	Nanomol = 10^{-9} Mol
PCS	=	Perchlorsäure
PEP	=	Phosphoenolpyruvat
PK	=	Pyruvatkinase
P-Tralase	=	Phosphotransacetylase
s. A.	=	Spezifische Aktivität = EE pro mg Protein
TCE	=	Trichloressigsäure
TPN	=	Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	=	Triphosphopyridinnucleotid, reduzierte Form
TRAM-Puffer	=	Pufferlösung aus Triäthanolamin und HCl
TRIS-Puffer	=	Pufferlösung aus Tris-hydroxymethyl-aminomethan und HCl (32)

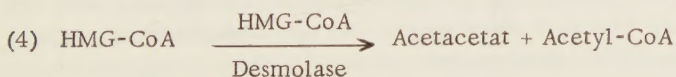
Nachdem im Jahre 1857 von Petters (73) Aceton im Urin von Zuckerkranken gefunden worden war, und Arnold (1) dessen Herkunft von der von Gerhard ebenfalls im Diabetikerharn entdeckten Acetessigsäure (32) nachgewiesen hatte, beschäftigte die Biosynthese dieser Säure und der Grund ihres excessiven Auftretens beim Coma hyperglycemicum die Diabetesforschung in hohem Maße. So konnte bald der Beweis ihrer Entstehung beim Abbau von Fettsäuren (21, 31) und der Möglichkeit ihrer Bildung aus Acetat (22, 30) erbracht werden. Mit der Entdeckung der aktivierten Essigsäure (66) war ein weiterer Schritt zur Klärung der Vorgänge des Fettsäurestoffwechsels und der mit ihm eng verknüpften Ketonkörperbildung getan worden. Als Endprodukt der Fettsäureoxydation fällt im intermediären Stoffwechsel Acetyl-CoA an (64, 82). Aus zwei Molekülen Acetyl-CoA kann, in einer durch das Enzym β -Ketothiolase katalysierten Reaktion, Acetacetyl-CoA gebildet werden (64) (Gl. 1):



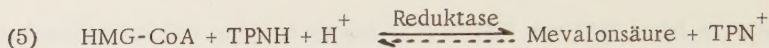
Die Vermutung, Acetacetyl-CoA sei der Ausgangspunkt für die Ketonkörpersynthese, konnte nun in letzter Zeit durch die Aufklärung der Biosynthese der Acetessigsäure durch F. Lynen und Mitarbeiter bewiesen werden (61), wobei jedoch nicht der von anderer Seite beschriebene Weg der einfachen Thioester-spaltung beschritten wird (83, 84) (Gl. 2).



Die Acetessigsäurebildung aus Acetacetyl-CoA vollzieht sich vielmehr unter katalytischer Beteiligung von Acetyl-CoA durch Einschaltung eines enzymatischen Kreisprozesses (HMG-CoA-Cyclus), in dessen erstem Schritt eine Kondensation der beiden Substanzen zu β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA erfolgt, während von diesem Kondensationsprodukt Acetacetat unter gleichzeitiger Freisetzung von Acetyl-CoA abgespalten wird (Gl. 3 u. 4).



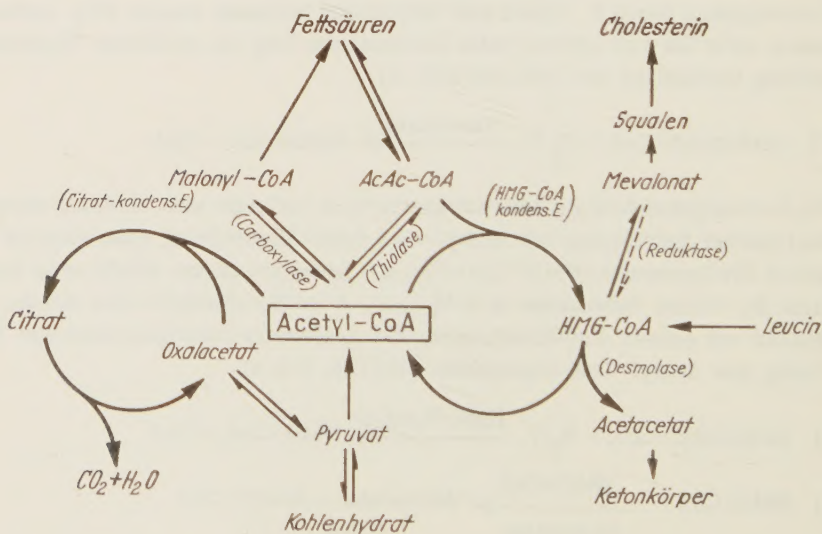
HMG-CoA ist aber nicht nur ein Zwischenprodukt auf dem Weg zur Acetessigsäure, sondern außerdem die Muttersubstanz der Cholesterinsynthese (6), deren erster Schritt in einer TPNH-abhängigen Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure besteht (25, 53) (Gl. 5):



Eine schematische Übersicht der an der Ketonkörper- und Cholesterinsynthese beteiligten Vorgänge ist in Abb. 1 dargestellt.

Mit den Untersuchungen der genannten Autoren war die Grundlage zu einem genaueren Studium der unter Ketosebedingungen herrschenden Stoffwechselsituation gegeben. Im einzelnen wurde in der vorliegenden Arbeit der Gehalt der Leber normaler, diabetischer und hungernder Ratten an Acetessigsäure, Oxalessigsäure und Mevalonsäure untersucht, sowie die Aktivität der an dem Umsatz dieser Substanzen beteiligten Enzyme, nämlich des Acetessigsäure synthetisierenden Enzymsystems, des HMG-CoA-spaltenden Enzyms und der HMG-CoA Reduktase gemessen.

Abb. 1: Hauptwege des Acetyl-CoA in der Leber.

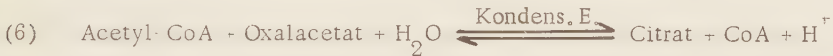


Ergebnisse :

A. Ketonkörperstoffwechsel:

1. Bestimmung des Oxalessigsäuregehaltes der Leber:

Die in den letzten Jahren zumeist vertretene Ansicht über die Ursachen der gesteigerten Acetessigsäurebildung beim Diabetes oder während ausgiebigen Hungers weist der Oxalessigsäure eine entscheidende Rolle zu (8, 26, 55, 58, 93, 94). In der Citrat-kondensierenden Reaktion (Gl. 6) stellt Oxalacetat für die Oxydation von Acetyl-CoA im Citronensäurecyclus einen limitierenden Faktor dar.



Demnach würde die verminderte Bildung von Oxalacetat z.B. als Folge einer Störung des Glukoseabbaus - zu einer verringerten Einschleusung von Acetyl-CoA in den Citronensäurecyclus und damit zu einer gesteigerten Ketonkörperbildung führen. Es lag deshalb nahe, zunächst diese Vermutung experimentell zu überprüfen. Die Oxalessigsäure- und Acetessigsäurebestimmungen in den Lebern normaler und diabetischer Ratten wurden unter Verwendung des von Kalnitsky und Tapley (47) angegebenen colorimetrischen Testes durchgeführt. Wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist, trat trotz beträchtlicher Ketose der diabetischen Tiere - im Durchschnitt betrug die Zunahme des Acetessigsäurespiegels der Leber fast das 4-fache der Norm - keine Veränderung des Oxalessigsäuregehaltes in der Leber auf. Ein vollkommen übereinstimmender Befund wurde von Kalnitsky und Tapley (47) und Shaw und Tapley (77) an diabetischen und hungernden Ratten erhoben.

2. Bestimmung des ASES und des HMG-CoA-spaltenden Enzymes:

Nach der Aufklärung der Biosynthese der Acetessigsäure war es natürlich von besonderem Interesse, das Verhalten der beteiligten Enzyme bei Zuständen, die mit einer gesteigerten Ketonkörperbildung einhergehen, zu prüfen. Unter Verwendung einer von F. Lynen (61) angegebenen Vorschrift wurde die Aktivität des Acetessigsäure synthetisierenden Enzymsystems (ASES) untersucht. Dies besteht in dem Zusammenwirken des HMG-CoA-kondensierenden mit dem HMG-CoA-spaltenden Enzym (letzteres auch als HMG-CoA Desmolase (54) oder HMG-CoA cleavage enzyme (3) bezeichnet). Wie schon von anderer Seite (72) mitgeteilt, wird die Reaktionsgeschwindigkeit im Gesamtsystem durch die HMG-CoA Kondensation bestimmt. Auch durch Zusatz gereinigter HMG-CoA

Tabelle 1: Der Gehalt normaler und diabetischer Rattenleber an Acetacetat und Oxalacetat.

Normal		Diabetisch	
Acetacetat	Oxalacetat	Acetacetat	Oxalacetat
14,5	10,1	74,5	10,1
14,7	14,5	37,0	10,8
19,3	14,8	61,9	12,7
18,7	14,1	41,2	13,1
13,2	13,4	120,0	12,1
12,9	12,6	49,0	13,8
16,5	12,7	73,3	10,7
23,3	10,2	52,5	13,3
M: 16,6	12,8	63,7	12,1

Alle Werte sind in nMol pro g Frischleber angegeben. Es handelt sich in jeder Zeile um die aus einer Rattenleber gewonnenen Ergebnisse.

Desmolase aus Rinderleber (61) ließ sich nur eine ganz geringfügige Steigerung der Acetessigsäuresynthese erreichen, weswegen es berechtigt erscheint, die Aktivität des ASES mit der des HMG-CoA-kondensierenden Enzyms gleichzusetzen. Die Erfassung der Aktivität des HMG-CoA-spaltenden Enzyms gelang durch Zusatz ausreichender Mengen HMG-CoA-kondensierenden Enzyms aus Hefe (61), wobei die Acetessigsäurebildung um das 4-6-fache anstieg.

a) Verhältnisse beim Diabetes:

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen des ASES und des HMG-CoA-spaltenden Enzyms in Lebern normaler und diabetischer Ratten sind in Tab. 2 dargestellt. Bei den diabetischen Tieren fällt die starke Zunahme des ASES auf. Sie erfolgte schon 2-5 Tage nach der diabetogenen Alloxaninjektion und war auch noch 4 Wochen später in demselben Ausmaß nachzuweisen. Eine ebenfalls beträchtliche Aktivitätssteigerung, wenn auch nicht in derselben Höhe wie das ASES, erfuhr das HMG-CoA-spaltende Enzym, das allerdings nur bei Tieren mit kurz dauerndem Diabetes bestimmt wurde.

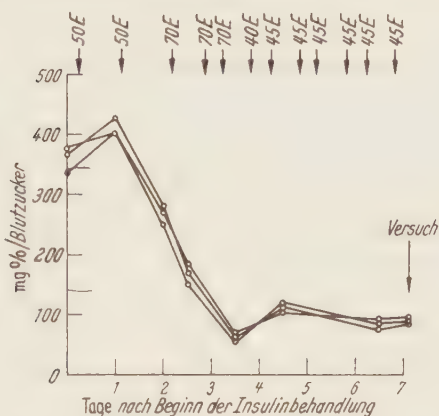
Die Aktivität des ASES ist ausgedrückt in EE pro mg Protein. Die Aktivität der HMG-CoA Desmolase wurde gemessen nach Zusatz von gereinigtem kondensierendem Enzym aus Hefe (61) in den ASES-Test. Die Berechnung der Standardabweichung und der Signifikanz der Ergebnisse erfolgte wie auf Seite 49 angegeben. Für die Zunahme des ASES und des HMG-CoA-spaltenden Enzyms beim Diabetes ergab sich dabei $P < 0,001$.

Um die diabetogene Herkunft der beobachteten Enzymveränderungen sicherzustellen, wurde geprüft, inwieweit sie durch eine Insulinbehandlung des Diabetes zur Norm zurückzubringen seien. Zu diesem Zweck erhielten drei Ratten, die 2 Wochen nach einer Alloxaninjektion einen durchschnittlichen Blutzucker von 320 mg-% gezeigt hatten, Depot-Insulin (Höchst) zur Einstellung des Blutzuckerwertes. Der tägliche Insulinbedarf der Tiere betrug dabei bis zu 80 E pro kg. In Abb. 2 ist der Verlauf der Blutzuckerkurven der behandelten Tiere dargestellt.

Tabelle 2: ASES der diabetischen Rattenleber:

Normal		Diabetisch		
		Dauer: 2-5 Tage		14 - 31 Tage
ASES	HMG-sp. E	ASES	HMG-sp. E.	ASES
61,7	450	159,5	791	52,3
53,4	548	196,0	921	120,2
91,1	545	161,4	706	178,2
61,7	480	111,7	667	188,5
100,0	300	331,0	656	276,1
103,0	288	176,1	793	551,0
51,0	376	198,0	902	235,0
40,2	477	168,1	686	271,4
80,3		159,5	638	135,2
95,0				139,0
99,0				155,7
87,6				
121,1				
59,7				
48,2				
52,9				
M: 75,4	433	184,6	751	209,6
s: 24,44	101,5	60,39	106,26	132,42
Diff:		+145%	+73,5%	+178%

Abb. 2: Blutzuckerkurven mit Insulin behandelter Ratten:



7 Tage nach Beginn der Behandlung wurde das ASES und das HMG-CoA-spaltende Enzym der Leber bestimmt. Wie dem in Tab. 3 zusammengestellten Versuchsergebnis zu entnehmen ist, haben sich die durch den Diabetes bedingten Änderungen der Enzymaktivitäten vollkommen zurückgebildet, die Aktivität der HMG-CoA Desmolase liegt sogar unter dem Normalwert.

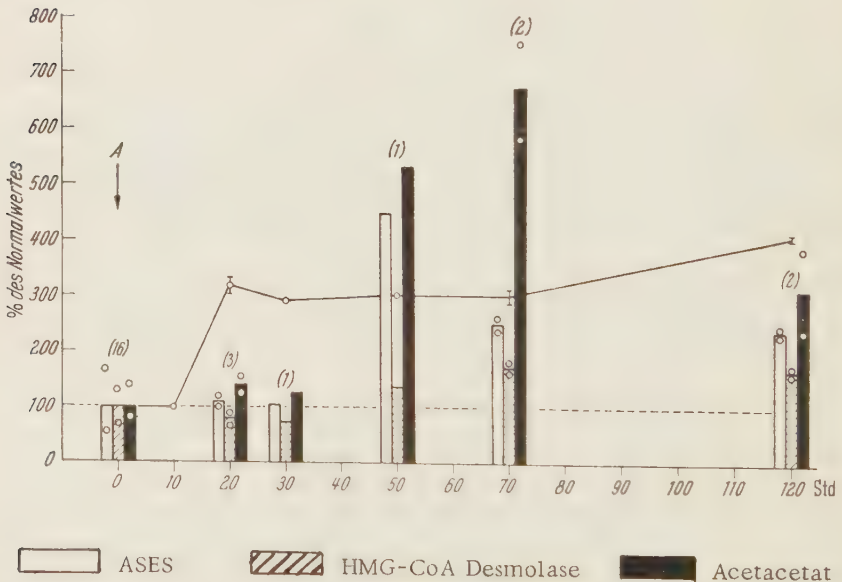
Tabelle 3: Verhalten des ASES und des HMG-CoA-spaltenden Enzyms in den Lebern mit Insulin eingestellter diabetischer Ratten:

ASES	HMG-CoA-sp.E
93,1	229,4
87,4	298,0
72,0	321,2
M: 84,2 (75,4)	282,86 (433)

Die eingeklammerten Zahlen geben die Normalwerte wieder. Die Aktivitäten sind in EE pro mg Protein angegeben.

Um tieferen Einblick in die Genese der beim Diabetes beobachteten Enzymveränderungen zu erhalten, wurde ihr Verhalten bei beginnendem Diabetes einer genaueren Untersuchung unterzogen. In Abb. 3 sind die Veränderungen des ASES, des HMG-CoA-spaltenden Enzyms, der Acetessigsäure und des Blutzuckers im Anschluß an eine diabetogene Alloxaninjektion dargestellt. Es fällt auf, daß nach 10 Stunden der Blutzucker ansteigt, während erst 40 Stunden später die Veränderungen der Enzymaktivitäten und des Acetessigsäurespiegels in der Leber auftreten. Dabei erfolgt der Anstieg des Acetessigsäuregehaltes genau gleichzeitig mit der Aktivitätssteigerung des ASES und des HMG-CoA-spaltenden Enzyms.

Abb. 3: Enzym- und Substratveränderungen bei beginnendem Alloxandiabetes:



Ausgezogene Linie: Blutzucker.

A = i. v. Injektion von 45 mg Alloxan pro Kilogramm Ratte in Citrat-Phosphatpuffer (52).

b) Verhältnisse bei der Hungerketose:

Ganz anders gestalteten sich die Verhältnisse bei der durch Hungern ausgelösten Ketose. In Tabelle 4 sind die Aktivitäten des ASES und des HMG-CoA-spaltenden Enzyms, sowie der Acetessigsäuregehalt der Leber nach 48 - 76-stündigem Hunger dargestellt. Überraschenderweise war hier, trotz beträchtlicher Ketose, keine Veränderung der Enzyme des HMG-CoA Cyclus festzustellen.

Tabelle 4: Das Verhalten des ASES, der HMG-CoA Desmolase und des Acetessigsäurespiegels der Leber nach 48 - 76 stündigem Hunger:

Acetacetat	ASES	HMG-CoA-sp. E.
74,5	103,0	---
82,8	57,8	---
94,0	31,4	- -
43,4	41,4	---
---	109,0	376,7
---	70,0	445
---	65,6	476
---	91,0	465
M: 73,6 (16,6)	71,1 (75,4)	440,6 (433)

Acetacetat ist in nMol pro g Frischleber angegeben, Enzymaktivitäten in EE pro mg Protein.

Die eingeklammerten Zahlen geben die Normalwerte wieder.

B. Cholesterinstoffwechsel:

1. Bestimmung von Mevalonsäure:

Seit der Erkenntnis, daß die im Jahre 1955 von Folkers (101) als Wachstumsfaktor für *Lactobacillus acidophilus* erkannte und in ihrer Struktur aufgeklärte Mevalonsäure ein wichtiges Zwischenglied der Cholesterinsynthese darstellt (87) und durch eine enzymatische Reduktion aus HMG-CoA entstehen kann, schien es wesentlich, ihr Verhalten bei der ketotischen Stoffwechsellaage, die ja unter anderem durch einen vermehrten HMG-CoA Gehalt der Leber gekennzeichnet ist (92, 96), zu untersuchen. Die zum Test verwendete Methode bestand in der Messung der ADP-Bildung während der enzymatischen Phosphorylierung von Mevalonat (38, 53) (Gl. 7).



Die im Zuge dieser Reaktion gebildete ADP wurde unter Verwendung eines Hilfsystemes bestehend aus PEP, PK, LDH und DPNH bestimmt (Gl. 8 u. 9).



Die Oxydation von DPNH, die in stöchiometrischem Verhältnis zu Mevalonsäure erfolgt, kann nun leicht an der Abnahme der spezifischen Absorption bei 366 mμ gemessen werden. Das für den Test benötigte Enzym MV-Kinase wurde nach (38) aus Hefe dargestellt.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse von Mevalonsäurebestimmungen in der Leber normaler, diabetischer und hungernder Ratten dargestellt. Während sich beim Diabetes keine Veränderung gegenüber den Kontrollen feststellen ließ, zeigten die Hungertiere nach 43-stündigem Fasten einen Rückgang des Mevalonsäurespiegels bis auf weniger als 20 % des Normalen, bei noch längerem Hungern bis auf kaum noch meßbare Werte. (Tabelle siehe nächste Seite!)

2. Bestimmung der HMG-CoA Reduktase:

Das von (25, 53) entdeckte Enzym HMG-CoA Reduktase bewirkt die in ihren Einzelheiten noch nicht vollständig aufgeklärte Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure, dem Ausgangspunkt für die Synthese der zum Aufbau des Cholesterinskelettes benötigten Isopreneinheiten (Gl. 5).

Meralonsäuregehalt in der Leber normaler, diabetischer und hungernder Ratten.

Normal	Diabetes	Hunger 43 - 76 Stunden
328	278	41,5
179	305	7,4
89	169	7,05
122	403	10,5
300	268	-
302	169	-
434	154	-
290	-	-
M: 256	249	16,4

Alle Werte sind in nMol pro g Frischleber angegeben.



Damit wird in einem TPNH abhängigen Schritt die Verbindung des Ketonkörperstoffwechsels mit dem des Cholesterins hergestellt. Zur Messung der Aktivität der HMG-CoA Reduktase bestimmt man die nach Inkubation mit HMG-CoA und TPNH gebildete Mevalonsäure, welche ihrerseits in dem auf Seite beschriebenen System mit ATP und MV-Kinase erfaßt wird.

Tabelle 6 zeigt die Reduktaseaktivitäten von Lebern normaler, diabetischer und hungernder Ratten. Analog zu den Untersuchungen des Mevalonsäuregehaltes zeigt sich auch hier keine Veränderung beim Diabetes, während die Aktivität der HMG-CoA Reduktase in den Lebern der hungernden Tiere fast bis auf 0 abgesunken war. Ein übereinstimmender Befund an hungernden Ratten konnte von N. Bucher (9) mit anderer Methodik erhoben werden.

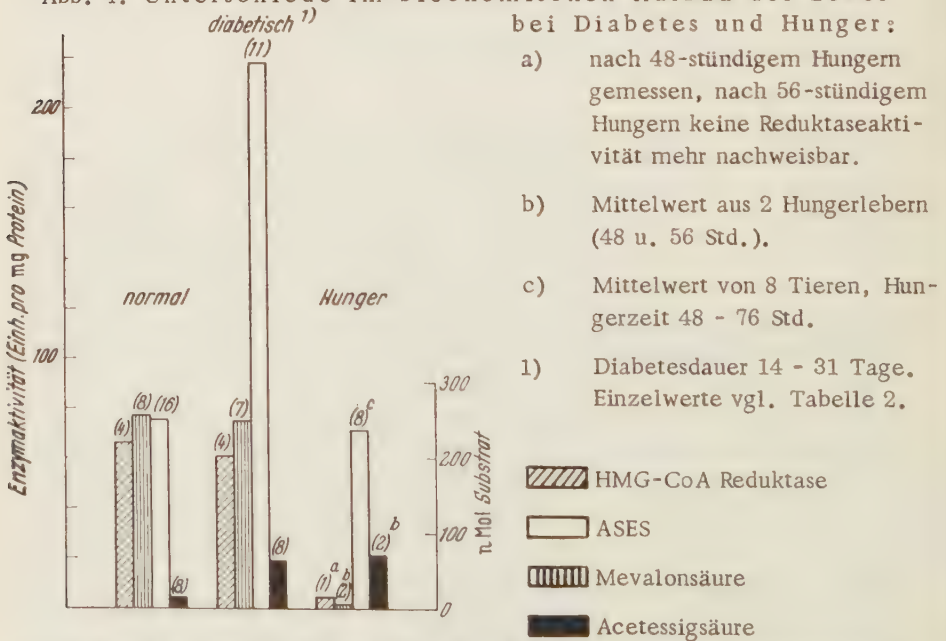
In Abb. 4 ist das Verhalten der untersuchten Enzyme und Substrate in der Leber während der durch Diabetes bzw. Hungern ausgelösten Ketose zusammenfassend

Tabelle 6: Das Verhalten der HMG-CoA Reduktase in den Lebern normaler, diabetischer und hungernder Ratten:

	Normal	Diabetisch	Hunger 43-76 Std.
	98,0	68,5	8,4
	30,0	57,2	5,2
	52,5	51,8	0,0
	83,4	63,7	1,2
M:	66,0	60,4	4,9

Die Aktivitäten sind in EE pro mg Protein angegeben.

Abb. 4: Unterschiede im biochemischen Aufbau der Leber bei Diabetes und Hunger:



Die eingeklammerten Ziffern geben die Zahl der untersuchten Tiere wieder.

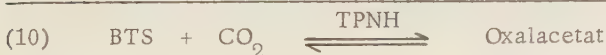
dargestellt. Beide Zustände sind zwar durch einen deutlich vermehrten Acet-
acetat Spiegel gekennzeichnet, darüber hinaus fällt aber beim Diabetes die
Zunahme des ASES auf, während für die Hungerketose das fast völlige Ver-
schwinden der HMG-CoA Reduktase und als Folge davon der Mevalonsäure ty-
pisch ist.

D i s k u s s i o n :

a) Ketonkörper-Stoffwechsel

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen zum Teil schon früher dis-
kutierte Vermutungen über den Mechanismus der Ketonkörper- und Cholesterin-
bildung beim Diabetes (99, 95), zum Teil konnten aber auch neue Ausblicke
auf die Pathophysiologie der Ketose gewonnen werden. Dabei wurde es möglich,
einige grundsätzliche Unterschiede zwischen der durch Diabetes und der durch
Hunger hervorgerufenen Ketose aufzudecken.

Die zur Zeit am häufigsten vertretene Vorstellung über die Ursache der Ketose
setzt voraus, daß es beim Diabetes zu einer Verminderung des Oxalessigsäurespie-
gels der Leber komme. Da aber Acetyl-CoA nur durch die Kondensation mit
Oxalacetat unter Bildung von Citronensäure zum Eintritt in den Citronensäure-
cyclus befähigt ist, kommt es zu einem Aufstau von Acetyl-CoA und damit zu
gesteigerter Acetessigsäurebildung. In Anbetracht der Tatsache, daß nach Unter-
suchungen Lamprechts (56) die stationäre Konzentration von BTS in Lebern
alloxandiabetischer Ratten fast um 50% im Vergleich zum Normalwert absinkt
und im Hungerzustand sogar noch tiefere Werte erreicht, scheint diese Theorie
zunächst durchaus vertretbar, da ja ein Teil der Oxalessigsäure durch die
Wood-Werkmann'sche Reaktion aus BTS gebildet wird (104). Diese erfolgt nach
Ochoa (71) in zwei Schritten. Zuerst kommt es zu einer TPNH-abhängigen
CO₂ - Fixierung an BTS unter Bildung von Malat durch das sog. "malic enzyme"
(Gl. 8). Malat wird dann im Citronensäurecyclus mit MDH oxydiert (Gl. 9, 10).



Der größte Teil der CO_2 -Fixierung in der Leber soll auf Kosten der geschil-
derten Reaktion gehen (59). Daneben besteht in einer weiteren, von Uffer
u. Mitarb. (89) angegebenen Reaktion, die Möglichkeit, Oxalacetat aus
PEP zu bilden (Gl. 11):

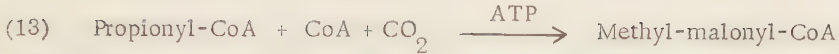


Schon vor einigen Jahren wurden jedoch Bedenken zu der Oxalacetat-Mangel-
theorie geltend gemacht (99), da keine sicheren Befunde dafür erbracht
werden konnten, daß eine Hemmung des Citronensäurecyclus in der Leber
diabetischer oder hungernder Tiere stattfindet, wie dies bei einem Rückgang
des Oxalacetatspiegels in der Leber zu erwarten wäre. Der CSC scheint viel-
mehr eine gewisse Beschleunigung zu erfahren (13, 24, 98), was sich schlecht
mit obiger Vorstellung in Einklang bringen läßt.

Mit der Entwicklung einer sehr empfindlichen Bestimmungsmethode für Oxal-
acetat (47) konnte nunmehr der Sachverhalt aufgeklärt werden. Wie aus Tab. 1
zu entnehmen ist, tritt beim Diabetes, trotz beträchtlicher Ketose, keine
Veränderung des Oxalacetatgehaltes der Leber auf. Dieser Befund, der auszugs-
weise schon an anderer Stelle veröffentlicht wurde, steht in guter Übereinstimmung
mit den Ergebnissen anderer Autoren (47). Von Shaw und Tapley (77) wurde das
gleiche Verhalten der Oxalessigsäure während der Hungerketose beobachtet. Da-
mit scheidet also eine Verminderung des Oxalessigsäurespiegels in der Leber als
ursächlicher Faktor für die Ketoseentstehung aus. Der diabetische und hungernde
Organismus hat offenbar die Fähigkeit, Oxalacetat in ausreichender Menge
auch noch auf andere Weise zu bilden. Als Möglichkeiten hierfür kommt ein-
mal die Oxalessigsäurebildung durch Transaminierung, z.B. durch die Oxal-
essigsäure - Glutaminsäure - Transaminase, in Betracht (Gl. 12):



Tatsächlich fanden Copenhaver et al. (13) eine vermehrte Aktivität der GOT
in der diabetischen Leber. Von Bedeutung in diesem Zusammenhang ist viel-
leicht auch die Carboxylierung von Propionsäure, die als Endprodukt des Ab-
baus ungeradzahlgiger Fettsäuren oder gewisser Aminosäuren, z.B. des Valins,
anfällt. Durch diese Reaktion kann Propionat in den Citronensäurecyclus einbe-
zogen werden, und so zu einer Neubildung von Oxalacetat führen. Die CO_2 -
Fixierung erfolgt nach vorheriger "Aktivierung" von Propionsäure zu Propionyl-
CoA, wobei in einer ATP-abhängigen Reaktion Methyl-malonyl CoA gebildet
wird (48) (Gl. 13):



Dieses wird nun durch eine enzymatische Isomerisierung (27), bei der interessanterweise Vit B₁₂ als Cofaktor beteiligt ist (18) in Succinyl-CoA umgewandelt, das über Bernsteinsäure in Oxalacetat übergehen kann. Nach Lardy (29) soll das beschriebene System allein in der Lage sein, den durch Diabetes oder Hunger bedingten Verlust der Oxalacetatbildung aus BTS zu decken. Die vorliegenden Befunde können als Beweis für diese Ansicht angesehen werden.

Zu einer plausiblen Erklärung für das Zustandekommen der Ketose gelangt man, wenn man sich, einer Berechnung F. Lynens ((65), siehe auch bei (99)) folgend, das unterschiedliche Verhalten von Glykogen bzw. Fett während der Oxydation vor Augen hält. Nach dieser Berechnung besteht bei den genannten Nahrungstoffen ein Unterschied in der Aufteilung der Energiegewinnung, der in Tabelle 7 sichtbar wird.

Tabelle 7: Unterschiede der Energieausbeute bei der Oxydation von Glykogen bzw. Fett (nach F. Lynen).

Glykogen (Mgew. (162) _n)			Palmito-oleo-stearin (Mgew. 860)		
Ac-CoA Mole	ATP-Äquiv. verbr.	ATP-Äquiv. gewonnen	Ac-CoA Mole	ATP-Äquiv. verbr.	ATP-Äquiv. gewonnen
a) 2	2	16	27	7	123
b) -	-	24	--	-	324
ATP-Netto-Bildung 38 Äquiv.			440 Äquiv.		
Mole Ac-CoA gebildet bei gleicher ATP-Ausbeute (14 Äquiv.)			3,27		

a) vor Eintritt in den Citronensäurecyclus

b) im Citronensäurecyclus

Im Falle des Stärkeabbaues erfolgt fast die Hälfte der gesamten ATP-Gewinnung schon vor Eintritt des Acetyl-CoA in den Citronensäurecyclus, während bei der Verbrennung von Fett in dieser ersten Etappe nur die Bildung von ungefähr einviertel der gesamten ATP-Ausbeute erreicht wird. Dies führt dazu, daß - wie aus Tab. 7 zu entnehmen ist - im Falle des Glycogenabbaues bei einer Ausbeute von 14 Äquivalenten ATP 2 Mol Acetyl-CoA gebildet werden, während beim Abbau der Fette im Fettsäurecyclus, auf gleiche ATP-Ausbeute bezogen, 3,27 Mol Acetyl-CoA, also die 1,6-fache Menge, entstehen. Da nun sowohl beim Diabetes als auch beim Hungerzustand der Organismus zur Deckung seines Energiebedarfes vermehrt auf den Fettabbau zurückgreifen muß, kommt es zu einem entsprechend erhöhten Acetyl-CoA Angebot an die Leber, das offenbar nicht bewältigt werden kann und deshalb die vermehrte Ketonkörperbildung in Gang setzt. Der hohe Energiegehalt der Fette ist für den Körper nur dann sinnvoll verwertbar, wenn diese auch total im Citronensäurecyclus verbrannt werden können.

Die vorliegenden Ergebnisse über das Verhalten der Oxalessigsäure zeigen, daß ein Absinken dieses Substrates in der Leber als auslösende Ursache für die vermehrte Bildung von Acetacetat nicht in Betracht kommt. Man muß vielmehr annehmen, daß das Überangebot von Acetyl-CoA - wie schon ausführlich diskutiert - den primären Anstoß der erhöhten Ketonkörperbildung darstellt. Diese Überlegung führt aber zu der Frage, warum die Leber dieses Überangebot nicht bewältigen kann. Hierzu findet sich die Antwort aus den Studien Ochoas über die Verteilung des "condensing enzyme" in verschiedenen Organen (71). Wie den auszugsweise in Tabelle 8 zusammengestellten Werten zu entnehmen ist, wird in der Niere eine 7-fach, im Skelettmuskel eine 9-fach und im Gehirn sogar eine 14-fach höhere Aktivität an "condensing enzyme" gefunden als in der Leber.

Tabelle 8: Die Aktivität des "condensing enzyme" in verschiedenen Organen (nach Ochoa):

Gewebe	Rind	Kaninchen	Ratte	Taube
Leber	0,06	0,03	0,01	0,05
Niere	0,16	0,20	0,07	---
Hirn	0,38	0,26	0,14	0,13
Skelettmuskel	---	0,14	0,09	1,9 ⁺
Herzmuskel	---	2,2	---	2,9

+ Brustmuskel

So erscheint es verständlich, daß die Leber, eben infolge der beschriebenen Minderleistung des kondensierenden Enzyms, nicht in der Lage ist, das vermehrte Angebot von Acetyl-CoA durch Oxydation im Citronensäurecyclus zu bewältigen, während im Gegensatz dazu die Peripherie leicht größere Mengen Acetyl-CoA der Verbrennung im CSC zuführen kann.

Die theoretisch geforderte Erhöhung des Acetyl-CoA-Spiegels in der Leber ließ sich bisher experimentell nicht sicher bestätigen. Die von (92, 96) bei normalen und diabetischen Ratten gefundenen Werte lassen wegen der großen Streuung der Einzelwerte eine genaue Aussage nicht zu. Ein sicherer Unterschied im Acetyl-CoA-Gehalt der Leber beim Diabetes im Vergleich zu Normaltieren konnte nicht beobachtet werden. Von Kühnau (12) wurde allerdings neben einer starken jahreszeitlichen Schwankung der Werte eine signifikante Steigerung des Acetyl-CoA-Gehaltes der diabetischen Rattenleber gegenüber der Norm gefunden.

Unter Zugrundelegung des durchschnittlichen Gehaltes der Leber an Oxalacetat von 12,8 nMol pro g Frischleber gelangt man zu einer aktuellen Konzentration, die in der Größenordnung der Michaeliskonstante des kondensierenden Enzyms von $6,41 \times 10^{-5}$ Mole/l (69) zu liegen kommt, dh. durch Erhöhung der Substratkonzentration könnte eine Beschleunigung der Citrat-kondensierenden Reaktion bewirkt werden. Daher ist es verständlich, daß andere Autoren (4, 23) eine Besserung der Hungerketose durch Zufuhr von Oxalessigsäure oder deren Vorstufen, wie Malat, Citrat, Fumarat erreichen konnten. Da jedoch durch diese Maßnahmen keine Beeinflussung der diabetischen Ketose zu erzielen war, schlossen sie auf einen pathogenetischen Unterschied zwischen beiden Ketosearten. Es erscheint aber möglich, daß beim echten Diabetes Faktoren, die zu einer Änderung der Permeabilitätsverhältnisse für die genannten Substrate führen, unberücksichtigt geblieben sind.

Nach der Aufklärung des HMG-CoA-Cyclus (61) war natürlich das Verhalten der zur Bildung von Acetessigsäure führenden Enzyms unter Ketosebedingungen von großem Interesse. Der Befund anderer Autoren (72), daß die Geschwindigkeit der Acetessigsäurebildung aus Acetyl-CoA von der Aktivität des HMG-CoA kondensierenden Enzyms begrenzt wird, konnte bestätigt werden. Das HMG-CoA-spaltende Enzym war im allgemeinen etwa 5-6mal aktiver als das kondensierende. Bei Messungen des Gesamtsystems (ASES) in der Leber diabetischer Ratten ergab sich eine im Durchschnitt ungefähr um das dreifache gegenüber der Norm erhöhte Aktivität. Eine ähnliche Reaktion zeigte auch das Enzym

HMG-CoA Desmolase, wenn auch die Steigerung hier nicht so ausgeprägt war wie beim ASES. Daß es sich um eine ursächliche Folge des diabetischen Zustandes handelt, wird durch die völlige Rückbildung der Enzymveränderungen bei Einstellung des Diabetes mit Insulin bewiesen. Diese Befunde bilden eine Ergänzung zu dem schon früher beobachteten Verhalten der Enzyme des Fettsäurecyclus beim Diabetes. O. Wieland et al. (97) fanden in den Lebern alloxandiabetischer Ratten eine Aktivitätssteigerung von β -Ketothiolase (+17,3%), β -Oxyacyldehydrogenase (+39%) und Acyldehydrogenase (+115%) gegenüber der Norm. Diese Befunde sind ein Ausdruck für den stark gesteigerten Fettabbau und wurden als adaptative Vorgänge gedeutet. Ob es sich im Fall der Aktivitätssteigerung der Enzyme des HMG-CoA-Cyclus ebenfalls um einen Anpassungsvorgang handelt, muß vorläufig offengelassen werden. Bei Betrachtung der Enzym- und Substratveränderungen bei beginnendem Alloxandibetes (Abb. 3) fällt jedoch das Fehlen der bei einem adaptativen Vorgang zu erwartenden Latenzzeit zwischen dem Auftreten der Substratveränderung und der Reaktion der Enzymaktivität auf. Das Verhalten des ASES beim Hunger (vgl. Tab. 4, S. 9) zeigt andererseits deutlich, daß auch eine beträchtliche Erhöhung des Acetessigsäuregehaltes der Leber nicht unbedingt von einer Vermehrung des ASES gefolgt sein muß.

Zu einer ungewöhnlichen Deutung des ketotischen Zustandsbildes sehen sich neuerdings van Bruggen und Mitarbeiter veranlaßt (19, 20). In Leberschnitten diabetischer Ratten untersuchten sie den Einbau von C^{14} -Acetat in Fettsäuren, Cholesterin und Acetacetat und fanden in allen Fällen eine Verminderung. Dagegen war der Einbau des Acetat-Kohlenstoffes in CO_2 vermehrt. Auch absolut gesehen konnten sie eine verringerte Bildung der drei erstgenannten Substanzen feststellen. Auf Grund dieser Beobachtung ziehen die Autoren den Schluß, daß die diabetische Stoffwechsellage durch eine erniedrigte Acetyl-CoA-Konzentration in der Leber gekennzeichnet sei. Die Hemmung der Fettsäuresynthese wurde schon früher von anderen Autoren beobachtet (85, 86) und darf als gesicherter Befund gelten. Über das Verhalten der Cholesterinsynthese beim Diabetes finden sich sehr unterschiedliche Angaben, die von einer excessiven (46) oder geringfügigen (98) Steigerung der Synthese bis zur hochgradigen Hemmung (37, 102, 103) differieren. Der verminderte Einbau von C^{14} -Acetat in Acetacetat könnte mit einer beim diabetischen Organismus gesteigerten Acetacetat-Bildung aus ketoplastischen Aminosäuren, wie z.B. Leucin (Darstellung des Reaktionsablaufes bei (40)) erklärt werden, die zu einer vermehrten Bildung nicht markierter Acetessigsäure führen würde. Unverständlich ist dagegen das Fehlen einer gesteigerten Acetacetatbildung absolut

gesehen bei den diabetischen Tieren. Dieser Effekt erscheint nur unter der Voraussetzung möglich, daß die Aktivität des Acetat-aktivierenden Enzyms einen limitierenden Faktor darstellt (Gl. 14).



Dagegen spricht aber der vermehrte C^{14} -Einbau in CO_2 , Ein solcher Befund steht außerdem in Widerspruch zu der klinischen Erfahrung, wonach die Schwere des diabetischen Zustandsbildes maßgeblich von der Größe der Ketonkörperbildung mitbestimmt wird und läßt Zweifel daran zu, ob die gewählte Versuchsanordnung die diabetische Stoffwechsellage mit der nötigen Genauigkeit wiedergibt.

Über die physiologische Rolle der von Stern und Mitarbeitern beschriebenen Acetacetyl-CoA-Deacylase (79, 80, 81) lassen die vorliegenden Ergebnisse keine Aussage zu. Das Enzym, das von anderen Autoren in Rinderleber nicht gefunden werden konnte (61), katalysiert eine Spaltung von Acetacetyl-CoA in Acetacetat und CoA durch Lösung der Thioesterbindung (Gl. 2). Seine biologische Bedeutung ist wahrscheinlich nicht sehr groß, denn die von anderer Seite (61) beobachtete unregelmäßige Verteilung der markierten C-Atome im Acetessigsäuremolekül bei Abbau radioaktiv markierter Fettsäuren (50) läßt sich nur mit Hilfe des HMG-CoA-Cyclus in befriedigender Weise erklären (Näheres siehe bei (61), Diskussion).

b) Cholesterin-Stoffwechsel

Da bei schwerem Diabetes mellitus klinisch immer eine Hypercholesterinämie beobachtet wird und als Spätfolge davon atherosklerotische Veränderungen auftreten, bildet naturgemäß das Verhalten des Cholesterinstoffwechsels einen Hauptpunkt der Diabetesforschung. In den letzten Jahren sind nun die wesentlichen Schritte der Cholesterinsynthese aufgedeckt worden. 1953 konnten Langdon und Bloch (57) die Bildung von Squalen aus C^{14} -Acetat beweisen, während Popäck die Entstehung von Cholesterin aus Squalen sicherte (74). Mit der Entdeckung, daß die von Folkers (101) als Wachstumsfaktor für *Lactobacillus acidophilus* gefundene Mevalonsäure alle anderen Substanzen in der Fähigkeit, als Vorstufe des Cholesterins zu wirken, übertrifft (87), war ein wichtiges neues Zwischenprodukt gefunden. Die enzymatische Bildung von Mevalonsäure aus HMG-CoA in einer TPNH-abhängigen Reaktion wurde von verschiedenen Autoren in den letzten

Jahren bewiesen (25, 53) und damit die enge Verbindung des Cholesterinstoffwechsels mit dem der Ketonkörper aufgereizt (siehe auch (40)). Da nach Bucher (15) das Ausmaß der Cholesterinsynthese von der Geschwindigkeit der Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat abhängt, wurde das Verhalten der HMG-CoA Reduktase bei diabetischen und hungernden Ratten bestimmt. Dabei zeigt sich beim Diabetes keine Veränderung der Aktivität gegenüber der Norm, ebenso blieb auch der gleichzeitig bestimmte Mevalonsäuregehalt der Leber in derselben Größe wie bei den Kontrolltieren.

Mit diesem Befund kann natürlich keine genaue Aussage über die wirkliche Rate der Cholesterinneubildung gemacht werden. Diese ist nur unter Verwendung der wesentlich empfindlicheren Isotopenmethode zu gewinnen, wobei der Einbau von C^{14} -Acetat in Cholesterin gemessen wird. Leider lassen die bisher bekannt gewordenen Untersuchungen noch keine genaue Aussage zu, da die Ergebnisse der einzelnen Autoren untereinander erheblich differieren. So fanden Hotta und Chaikoff (46) einen erheblich, O. Wieland (98) einen mäßig vermehrten Einbau von C^{14} -Acetat in Cholesterin, während im Gegensatz dazu Müller (37) einen gegenteiligen Effekt beobachtete. Auch van Bruggen konnte nach kürzlich erschienenen Arbeiten eine erhebliche Verminderung der Cholesterinneubildung finden (102, 103), wobei es aber nicht zu einer Veränderung des Cholesteringehaltes der untersuchten Organe an sich kam.

Genauere Untersuchungen des für die Reduktasereaktion benötigten Substrates und Coenzymes lassen jedoch trotzdem gewisse Aussagen über die mögliche Größe der HMG-CoA Reduktion zu. So fand Weiß (92) eine Erhöhung des HMG-CoA Gehaltes der Leber um ungefähr 50% sowohl bei diabetischen als auch bei hungernden Tieren. Dieser Befund bestätigt einerseits die vermehrte Acetacetatbildung über den HMG-CoA-Cyclus, läßt aber auch eine gewisse Bevorzugung der Cholesterinsynthese erwarten. Ob in Analogie zu der bekannten Hemmung der Fettsynthese aus Kohlenhydraten beim Diabetes (85, 86), zu deren Erklärung ein Mangel an reduzierten Pyridinnucleotiden (45, 76) herangezogen wurde, ein ähnlicher Mechanismus eine Rolle spielen kann, erscheint fraglich. Es gelingt zwar, in vitro durch Zusatz eines TPNH-liefernden Systems zu Leberhomogenaten diabetischer Tiere die Cholesterinneubildung aus C^{14} -Acetat stark zu beschleunigen (76). Jedoch lassen sich in vivo über das Verhalten des zur Reduktion von HMG-CoA benötigten TPNH keine übereinstimmenden experimentellen Aussagen finden. Nach (7, 44) ist während der acidotischen Stoffwechsellaage das Verhältnis DPN/TPNH bzw. TPN/TPNH zugunsten der oxydierten Form verschoben, jedoch konnten auch gegenteilige Befunde

(33, 34) erhoben werden, wobei gleichzeitig der Gehalt der diabetischen Leber an Pyridinnucleotiden insgesamt vermindert war. In Anbetracht der Tatsache, daß sich eine Verminderung der TPNH-Konzentration, die zu einer Hemmung von reduktiven Synthesevorgängen führen würde, offenbar nicht nachweisen läßt, erscheint eine Verringerung der Cholesterinneubildung unwahrscheinlich, ebensowenig wie das Verhalten des TPNH die Hemmung der Fettsäuresynthese befriedigend erklären kann. Die normale Reduktaseaktivität, der unveränderte Mevalonsäure- und der vermehrte HMG-CoA-Gehalt der diabetischen Leber rechtfertigen vielmehr die Annahme, daß die Cholesterinbildung mindestens in normalem Ausmaß, wenn nicht sogar beschleunigt erfolgt, wofür auch in letzter Zeit experimentelle Anhaltspunkte erbracht werden konnten (98).

Ein ganz anderes Verhalten zeigte die HMG-CoA Reduktase und ihr Reaktionsprodukt Mevalonsäure bei der Hungerketose. Die überraschenden Befunde von N. Bucher (9), die ein völliges Verschwinden des Enzyms in der Rattenleber nach ausgiebigem Fasten festgestellt hatten, konnten bestätigt werden. Ebenso sank auch der Mevalonsäuregehalt der Leber auf sehr geringe Werte. Zweifellos ist dieser Enzymverlust die Ursache der schon früher bei Mensch und Tier im Anschluß an Hungern beobachteten Senkung des Serum-Cholesterins (67, 68). Welche Ursachen im einzelnen für den Enzymschwund verantwortlich sind, kann noch nicht entschieden werden.

Nach unseren heutigen Kenntnissen ist also die durch Diabetes bzw. Hunger hervorgerufene Ketose durch folgende Stoffwechselveränderungen gekennzeichnet:

1. Der Organismus ist in beiden Fällen nicht mehr in der Lage, seinen Energieverbrauch aus der Verbrennung von Kohlenhydraten zu decken. Er muß vielmehr auf eine vermehrte Oxydation von Fett (und Eiweiß) zurückgreifen.
2. Bei der Bevorzugung der Fettoxydation wird der Leber eine größere Menge an Acetyl-CoA angeboten, als dies beim KH-Abbau der Fall ist. Sie ist jedoch nicht in der Lage, dieses Überangebot auf dem Wege des Citronensäurecyclus zu bewältigen, so daß es zu einem, experimentell allerdings nicht sicher faßbaren, Aufstau von Acetyl-CoA kommt, der eine vermehrte Ketonkörperbildung als Ausweichreaktion bedingt. Die mangelnde Fähigkeit der Leber, Acetyl-CoA zu verbrennen, ist nicht durch einen verminderten Oxalacetatspiegel, sondern durch die ge-

ringe Aktivität des Citrat-kondensierenden Enzyms der Leber verursacht.

3. Eine zusätzliche Bevorzugung der Acetessigsäurebildung tritt beim Diabetes infolge der Aktivitätssteigerung der Enzyme des HMG-CoA-Cyclus auf, welche in ihren Ursachen nicht geklärt ist. Bei der Hungerketose bleibt die Aktivität der betreffenden Enzyme trotz beträchtlicher Ketose im Bereich der Norm.
4. Die Aktivität des zur Cholesterinsynthese überleitenden Enzyms HMG-CoA Reduktase ist beim Diabetes nicht verändert, der Gehalt der Leber an HMG-CoA dagegen um 50% erhöht. Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Cholesterinsynthese haben zu widersprechenden Resultaten geführt. Eine totale Hemmung dieses Vorganges erscheint jedoch, ebenso wie die excessive Steigerung (46), nach den vorliegenden Befunden wenig wahrscheinlich. Man wird annehmen dürfen, daß die Cholesterinsynthese beim Diabetes sich nicht wesentlich von der Norm unterscheidet. Damit entfällt auch die Vorstellung, daß der erhöhte Serumcholesterinspiegel des Diabetikers auf eine gesteigerte Neubildung von Cholesterin zurückgeht. Im Gegensatz zum Diabetes verschwindet die HMG-CoA Reduktase bei der Hungerketose bis auf minimale Werte aus der Leber.
5. Ein gleichsinniges Verhalten zeigt der Gehalt der Leber an Mevalonsäure bei den genannten Ketosezuständen.

Beim Vergleich zwischen diabetischer und durch Hunger ausgelöster Ketose erscheint es aufschlußreich, die um das HMG CoA konkurrierenden Enzyme einander gegenüberzustellen, da sich ja am HMG-CoA das Ausmaß der Acetessigsäure bzw. Cholesterinbildung entscheidet. Wie aus den Tabelle 2 und 6 hervorgeht, ist die HMG-CoA Desmolase rund 6-8 mal aktiver als die Reduktase. Unter der Voraussetzung, daß beide Enzyme die gleiche Affinität zum Substrat haben, und daß dieses ungefähr in halbmaximaler Sättigung vorliegt, würde sich das vorhandene HMG-CoA Angebot in der Leber zu etwa 80-90% auf die Bildung von Acetacetal und zu etwa 10-20 % auf die Bildung von Mevalonat auswirken.

Tatsächlich kann man auf Grund des gefundenen HMG-CoA Gehaltes der Leber mit einer aktuellen Konzentration rechnen, die in der Größenordnung der Michaeliskonstanten für Rinderleberdesmolase von $5,1 \times 10^{-6}$ Mol/l (54) zu liegen kommt. Für Leberreduktase liegen keine vergleichbaren Werte vor,

die aus Hefe gereinigte Reduktase hat eine Michaeliskonstante $K_M = 1,5 \times 10^{-6}$ Mol/l (53). Die Steigerung der Desmolaseaktivität zusammen mit dem erhöhten HMG-CoA Gehalt der Leber würde sich beim Diabetes also vor allem in einer zusätzlichen Steigerung der Acetacetatbildung auswirken, während, wie schon oben besprochen, die Wirkung auf die Cholesterinsynthese eine verhältnismäßig geringe sein müßte, was ja auch aus dem unveränderten Mevalonsäure- und Cholesteringehalt der Leber hervorgeht. Bei der Hungerketose fällt die HMG-CoA Reduktase vollständig aus, so daß die Desmolase allein ihre Wirkung auf die HMG-CoA Spaltung entfalten kann.

Zwei andere, am Stoffwechsel des HMG-CoA beteiligte Enzyme können hier außer acht gelassen werden, da sie, wie im Fall der von Dekker und Mitarbeitern beschriebenen HMG-CoA Deacylase (16) eine zu geringe Aktivität zeigen, oder wie bei der Methylglutaconase (41) aus reaktionstechnischen Gründen keine Rolle spielen können.

Experimenteller Teil

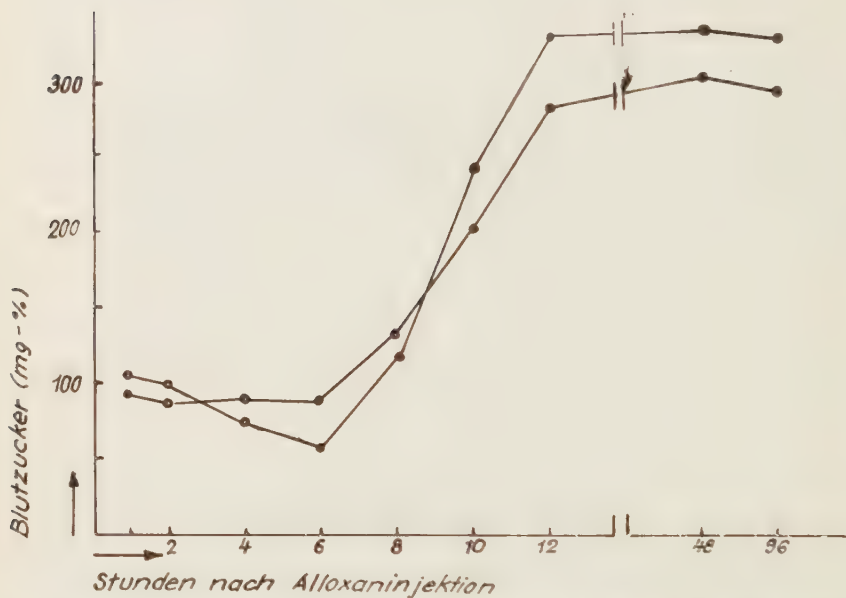
1. Tiere und Diabeteserzeugung:

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten (Sprague-Dawley-Stamm) mit einem Mindestgewicht von 200 g. Die Tiere erhielten ein Standardmischfutter +) und Wasser ad libitum. Der Diabetes wurde erzeugt durch eine einmalige intravenöse Injektion von Alloxan in 2%iger Lösung, das einmal aus Wasser umkristallisiert wurde, um stark toxische Zersetzungsprodukte zu entfernen. Bei diesem Vorgehen wurde Alloxan bei 37°C in dest. Wasser möglichst konzentriert gelöst und anschließend unter Lichtabschluß auf 0°C abgekühlt und über Nacht stehen gelassen, wobei sich weiße, nadelförmige Kristalle bildeten, die im Exsikkator getrocknet wurden. Zur Injektion wurde das so gewonnene Präparat nach (52) in 0,125 M Citrat-Phosphatpuffer pH 4,0 gelöst. Bei diesem pH ist Alloxan wesentlich stabiler als im Neutralen, so daß die diabetogene Dosis (70 mg Alloxan pro kg Ratte bei pH 7 (100)) auf 45 mg/kg Ratte gesenkt werden konnte, wodurch natürlich die toxische Nebenwirkung auf das Parenchym von Leber und Niere vermindert wurde. Im Anschluß an eine einmalige diabetogene Injektion stieg der Blutzucker der Tiere, nach einer anfänglichen hypoglykämischen Phase in der 4.-7. Stunde, ab der 10. Stunde allmählich auf diabetische Wer-

+) Firma Laatz, Euskirchen/Rhld., oder "Altromin R" der Firma Altrogge, Lage/Lippe.

te an, um sich im Lauf der nächsten Tage auf ein konstantes Niveau einzuspielen (siehe Abb. 5).

Abb. 5: Verhalten des Blutzuckerspiegels nach Alloxaninjektion (45 mg/kg, gelöst in Citrat-Phosphatpuffer pH4):

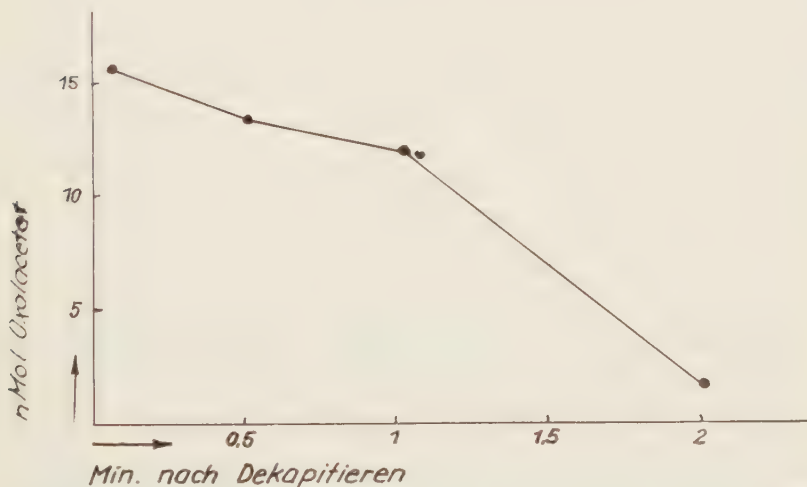


Zur Kontrolle des Diabetes wurden jeweils nach einer 12-stündigen Fastenperiode bei den diabetischen Tieren Blutzucker (28), Harnzucker (enzymatisch nach (49)) und die in 12 Stunden ausgeschiedene Harnmenge bestimmt. Bei den insgesamt 25 untersuchten diabetischen Tieren betrug der durchschnittliche Blutzucker nach 12-stündigem Fasten 364 mg-% (Mindestwert 250 mg-%), die Glukoseausscheidung in 12 Stunden 2,4 g und die Harnmenge 30 ml. Von 10 gespritzten Ratten entwickelten 3-4 einen brauchbaren Diabetes, die restlichen gingen zum Teil an der toxischen Wirkung des Alloxans zugrunde, zum Teil zeigten sie sich als unempfindlich gegenüber Alloxan. Versuchsweise Erhöhung oder Erniedrigung der Dosis brachte keine Verbesserung der Ausbeute. Zum Versuch wurden die geeigneten Tiere ebenfalls nach einer 12-stündigen Fastenperiode herangezogen, um möglichst gleichmäßige Ausgangsbedingungen zu erhalten.

2. Organentnahme und Verarbeitung:

Zur Bestimmung der teilweise empfindlichen Substrate erwies sich die übliche Methode der Leberentnahme aus dem vorher dekapierten und ausgebluteten Tier als ungeeignet. Bei Messungen der sehr labilen Oxalessigsäure nämlich zeigte es sich, daß ihre Konzentration schon 30 Sek. nach dem Dekapitieren des Tieres stark absinkt, so daß es also darauf ankommt, die zeitliche Differenz zwischen dem Tod des Versuchstieres und der Organentnahme möglichst auszuschalten (siehe Abb. 6).

Abb. 6 Veränderung des Oxalessigsäuregehaltes der Leber in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Tode:



Um dies zu erreichen, wurden die Tiere in Äthernarkose versetzt, das Organ zunächst, ohne das Gefäßsystem zu verletzen, freigelegt und daraufhin der Gefäßstiel mit einem Schnitt durchtrennt. Dann wurde die Leber sofort in flüssigen Sauerstoff gebracht, was nur wenig Zeit in Anspruch nahm, und bis zum völligen Durchfrieren darin belassen. Ein späterer Vergleich der auf diese Weise erhaltenen Werte mit dem Frierstoppverfahren (43) zeigte sogar für die hochempfindliche Oxalessigsäure keinen Unterschied zwischen beiden Methoden. Die Weiterverarbeitung der Leber war je nach der Art der nun folgenden Untersuchung verschieden.

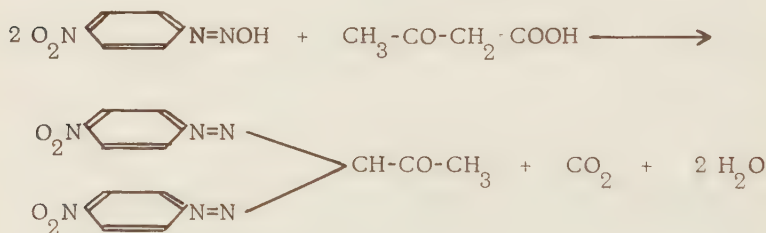
3. Substratbestimmungen:

a) Herstellen der Homogenisate:

Nach dem völligen Durchfrieren wurde ein geeignetes Stück der Leber möglichst schnell abgewogen (Einwaage ungefähr 3 g) und dann 3 Min. bei 0°C (Kühlung) mit dem 4-fachen Volumen vorgekühlter 5%iger TCE im Potter-Homogenisator (75) aufgeschlossen. Anschließend wurde das Homogenisat 10 Min. bei 20 000 x g und 0°C zentrifugiert. Das klage Überstehende wurde zur kombinierten Bestimmung von Acetacetat und Oxalacetat und zur Bestimmung von Mevalonat verwendet.

b) Bestimmung von Acetacetat und Oxalacetat:

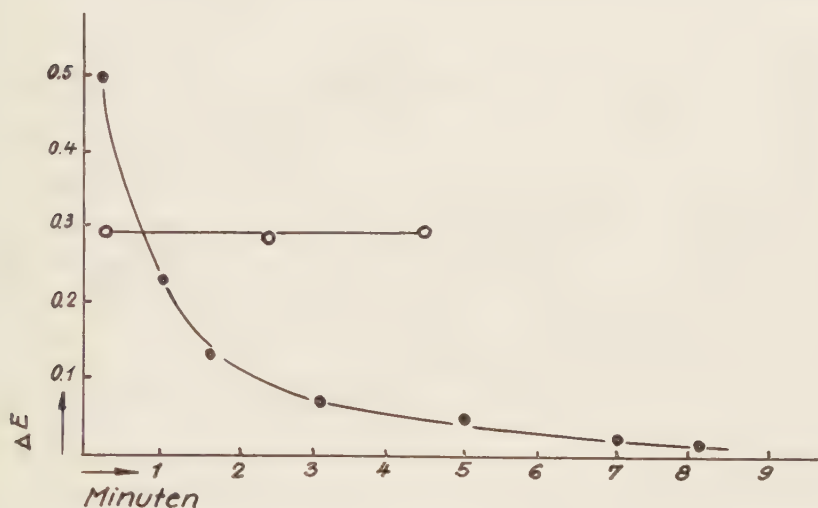
Die Bestimmung richtete sich im wesentlichen nach der Vorschrift von Kalnitsky und Tapley (47). Dem Test liegt die schon von Walker (90) für die Messung des Acetessigsäuregehaltes von Organextrakten verwendete Reaktion von Acetacetat mit dem Diazoniumsalz des p-Nitroanilin (= Diazoreagens) zugrunde (Gl. 15):



Das dabei entstehende N-N'-di-(p-Nitrophenyl)-C-acetylformazan ist eine verhältnismäßig stabile Verbindung. Mit Essigsäureäthylester extrahiert, hat es ein Absorptionsmaximum bei 440 mμ, welches für die colorimetrische Bestimmung herangezogen wird. Oxalessigsäure reagiert im Prinzip genau wie Acetessigsäure. Der gebildete Farbstoff hat dasselbe Absorptionsmaximum, ist aber in saurer Lösung nicht stabil, sondern entfärbt sich innerhalb 8 Min. bei 0°C vollständig. (siehe Abb. 7)

Setzt man in den Test ein Gemisch aus Acetacetat und Oxalacetat ein, und extrahiert sofort nach Beendigung der Farbreaktion mit Essigsäureäthylester, so erfaßt man die Extinktion des von beiden Substanzen gebildeten Farbstoffes.

Abb. 7: Entfärbung des durch Oxalessigsäure gebildeten Farbstoffes in saurer Lösung bei 0°C:



● Durch Oxalessigsäure gebildeter Farbstoff

○ Durch Acetessigsäure gebildeter Farbstoff

Läßt man nun in einer Parallelbestimmung den ganzen Ansatz nach dem Abschluß der Farbreaktion 8 Min. bei 0°C in saurer Lösung stehen und extrahiert dann erst, so erfaßt man nur den durch Acetacetat gebildeten Farbkomplex. Die Differenz zwischen beiden Extinktionen entspricht der eingesetzten Oxalessigsäure. Da außer Acetacetat und Oxalacetat noch eine ganze Reihe anderer Substanzen wie Aminosäuren, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren u. a. m. mit dem diazotierten p-Nitroanilin Farbstoffe ähnlicher Absorption bilden, ist es notwendig, zu jeder Bestimmung einen Blindwert mitlaufen zu lassen, der ebenfalls das zu testende Gemisch enthält. Dieses wird vor der Farbentwicklung bei stark saurem pH 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, wodurch Acetacetat und Oxalacetat, nicht aber die störenden Substanzen zerstört werden. Lediglich Ascorbinsäure kommt in der Leber in Konzentrationen vor, die für die Bestimmung einen Störfaktor darstellen könnten. Sie wird jedoch durch Zusatz von NaNO_2 leicht aus dem Leberextrakt entfernt.

Durchführung des Testes:

Man pipetiert in 3 Reagensgläser A, B und C hintereinander:

Glas A:

Oxalacetat und Acetacetat enthaltende Probe	2,00	ml
---	------	----

NaNO_2 0,25 %ig	0,40	ml
--------------------------	------	----

30 Sek. stehen lassen.

Acetatpuffer 1,4 M, pH 5,2	2,00	ml
----------------------------	------	----

Diazoreagens	3,00	ml
--------------	------	----

Zur Farbentwicklung 20 Min. bei 25°C inkubieren, dann 3 Min. im Eisbad stehen lassen.

Anschließend Zusatz von

HCl 5N	6,00	ml
--------	------	----

Essigsäureäthylester	6,00	ml
----------------------	------	----

Ausschütteln.

Zwischen der Zugabe von HCl und dem Ausschütteln mit Essigsäureäthylester dürfen nicht mehr als 10 Sek. verstreichen, da sonst die Entfärbung des durch Oxalacetat gebildeten Farbstoffes beginnt.

Glas B:

Oxalacetat u. Acetacetat enthaltende Probe	2,00	ml
--	------	----

NaNO_2 0,25 %ig	0,40	ml
--------------------------	------	----

30 Sek. stehen lassen.

Acetatpuffer 1,4 M, pH 5,2	2,00	ml
----------------------------	------	----

Diazoreagens	3,00	ml
--------------	------	----

Zur Farbentwicklung 20 Min. bei 25°C inkubieren, dann 3 Min. im Eisbad stehen lassen.

Anschließend Zusatz von HCl 5 N	6,00	ml
---------------------------------	------	----

8 Min. bei 0°C stehen lassen.

Essigsäureäthylester	6,00	ml
----------------------	------	----

Ausschütteln.

G l a s C:

Oxalacetat u. Acetacetat enthaltende Probe	2,00	ml
--	------	----

5 Min. in kochendem Wasserbad erhitzen.

Weiterbehandlung wie Glas B.

Die Extinktion der Essigsäureäthylester-Extrakte wird bei einer Schichtdicke von 3 cm und der Wellenlänge 436 mμ (Photometer Eppendorf) abgelesen.

Zusammensetzung des Diazoreagens:

p-Nitroanilin 0,05 % in 0,05 N HCl	20,00	ml
------------------------------------	-------	----

NaNO ₂ 0,5 %ig	3,00	ml
---------------------------	------	----

Im Eisbad kühlen, wobei sich rasch das Diazoniumsalz bildet, dann Zusatz von

Na-Acetat 0,2 M	7,00	ml
-----------------	------	----

NaNO₂ muß täglich frisch angemacht werden! Das Diazoreagens soll unmittelbar nach der Bereitung verwendet werden!

Abb. 8 zeigt die mit Acetessigsäure bzw. Oxalessigsäure gefundenen Eichkurven, Abb. 9 die Bestimmung von Oxalessigsäure zusammen mit steigenden Mengen Acetessigsäure.

Die Eignung des Testes für die Bestimmung von Oxalacetat in Leberextrakten wurde durch Vergleich von colorimetrisch gefundenen Werten mit solchen, die unter Verwendung eines einfachen optisch-enzymatischen Testes (91) erhalten worden waren, geprüft. Die für die Durchführung dieses Testes verwendete Reaktion war die enzymatische Reduktion von Oxalacetat zu Malat mit DPNH und MDH nach Gl. 9.

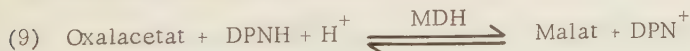
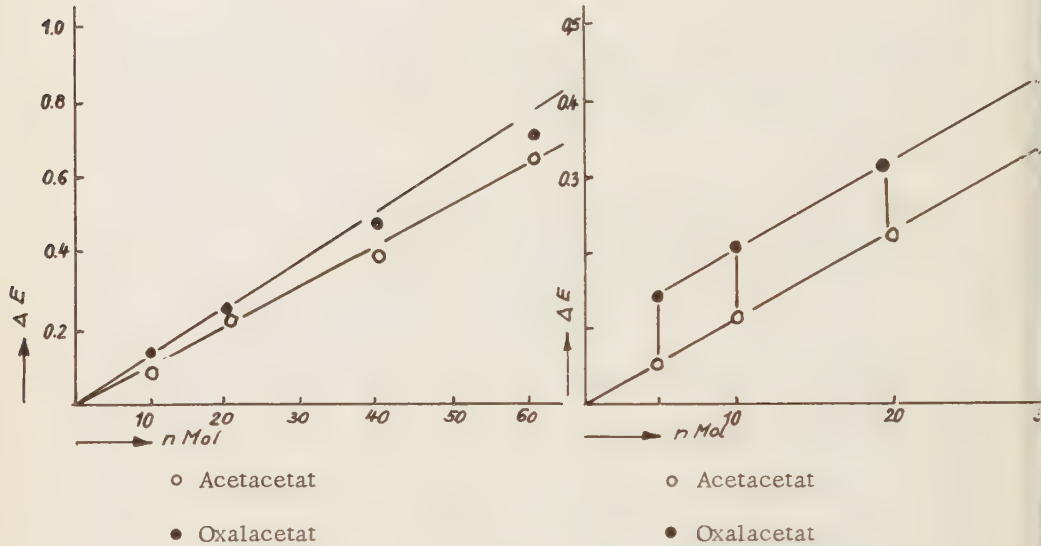


Abb. 8/9: Eichkurven für die kombinierte Bestimmung von Acetacetat und Oxalacetat:



Der Verbrauch von DPNH wurde photometrisch bei 366 mμ gemessen. Die Berechnung erfolgte aus ΔE_{366} unter Zugrundelegung des molaren Extinktionskoeffizienten von DPNH $\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6 \text{ (cm}^2/\text{Mol)}$ (42).

Durchführung des Testes:

In eine Küvette von 2 cm Schichtdicke pipetiert man nacheinander:

1,00 M TRIS-Puffer pH 7,2	0,50 ml
0,02 M DPNH	0,02 ml
TCE-Extrakt	3,50 ml
MDH 25 γ	0,03 ml
Endvolumen	4,05 ml

Der Test wird mit MDH gestartet. Man beobachtet die Abnahme der Extinktion bei 366 mμ bis zum Stillstand der Reaktion.

Die mit dieser Methode gefundenen Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit den im colorimetrischen Test beobachteten, wie aus den in Tabelle 9 zusammengestellten Ergebnissen von Doppeltbestimmungen mit beiden Methoden ersichtlich wird.

Tabelle 9. Oxalacetat im colorimetrischen und im enzymatischen Test:

Enzymatisch bestimmt	Colorimetrisch bestimmt
10,9	10,1
13,4	14,5

Alle Werte sind in nMol pro g Frischleber angegeben.

Der optisch-enzymatische Test hatte gegenüber dem colorimetrischen den Nachteil einer wesentlich geringeren Empfindlichkeit, weswegen auch alle weiteren Versuche ausschließlich mit dem colorimetrischen Verfahren gemacht wurden.

Zu Leber vor dem Homogenisieren zugesetzte Oxalessigsäure konnte nahezu quantitativ wiedergefunden werden (siehe Tab.10).

Tabelle 10: Verhalten zugesetzter Oxalessigsäure im colorimetrischen Test:

Oxalacetat	Zusatz	berechnet	gefunden	%
12,3	30	42,3	41,9	97
10,6	30	40,6	40,3	99
13,4	60	73,4	73,6	101

Alle Werte sind in nMol angegeben.

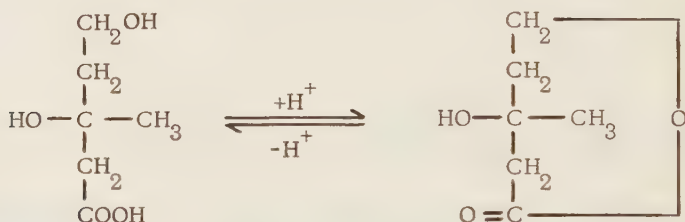
Die Reinheit der zur Aufstellung einer Eichkurve verwendeten Oxalessigsäure (Fa. Th. Schuchard) wurde mit Hilfe des optisch-enzymatischen Testes bestimmt. Das Präparat erwies sich als nahezu 100 %ig.

Acetessigsäure wurde durch alkalische Verseifung von Acetessigester mit NaOH 9 Std. bei 25°C gewonnen (90). Die Gehaltsbestimmung erfolgte manometrisch mit Anilincitrat (17).

c) Bestimmung von Mevalonat:

Die Bestimmung von MVS geht ebenfalls von dem auf S. 26 beschriebenen TCE-Extrakt der Leber aus. Bei Einsatz in den Test ließen sich jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen, so daß sich die Notwendigkeit ergab, MVS mit Hilfe einer geeigneten Technik zu extrahieren.

Dem hierzu verwendeten Verfahren liegt die Tatsache zugrunde, daß MVS in saurer Lösung ein leicht ätherlösliches inneres Lakton bildet nach der Gleichung:



Im TCE-Extrakt liegt sie also bereits in ätherlöslicher Form vor und kann leicht extrahiert werden, wobei folgendes Vorgehen angewendet wurde:

4 ml des TCE-Extraktes wurden mindestens 5 Stunden mit 25 ml peroxydfreiem Äther perforiert. Anschließend wurde das pH des Ätherextraktes durch Zugabe von 2 N KOH auf ungefähr pH 7,5 - 8 eingestellt und der Äther im Vakuum abgezogen. Nach dem Aufnehmen des Rückstandes in H₂O erfolgte eine nochmalige Einstellung auf pH 7,5 und Zusatz von H₂O bis zu einem Endvolumen von 1 ml. Von dem auf diese Weise erhaltenen Extrakt wurde eine geeignete Menge zur Bestimmung des Mevalonsäuregehaltes eingesetzt.

Diese erfolgte in einem optisch-enzymatischen Test, wobei die durch MV-Kinase katalysierte Phosphorylierung von MVS unter Einsatz von ATP verwendet wurde (38, 39, 88), die nach folgender Gleichung verläuft (Gl. 7)



Das gemäß dieser Gleichung gebildete ADP wird durch Koppelung an folgendes Hilfssystem bestimmt (10) (Gl. 8,9).



Die in stöchiometrischem Verhältnis zu MVS erfolgende Oxydation von DPNH kann leicht an der Abnahme der spezifischen Absorption bei 366 mμ gemessen werden.

Durchführung des Testes:

Man pipettiert hintereinander in 2 Küvetten A und B (Schichtdicke 1 cm):

	A	B
0,20 M TRAM-Puffer pH 7,45	1,50 ml	1,50 ml
KCl+MgSO ₄ Lösung (1,6 M KCl+0,4 M MgSO ₄)	0,10 ml	0,10 ml
Serumalbumin 1%ig	0,10 ml	0,10 ml
0,10 M PEP	0,02 ml	0,02 ml
0,02 M DPNH	0,02 ml	0,02 ml
0,05 M ATP	0,02 ml	0,02 ml
Pyruvatkinase 10 γ	0,01 ml	0,01 ml
LDH 25 γ	0,01 ml	0,01 ml
MV-Kinase 3-4 EE	0,03 ml	0,03 ml
Ätherextrakt	0,50 ml	-----
H ₂ O	-----	0,50 ml
Endvolumen	2,31 ml	2,31 ml

Der Test wird mit MV-Kinase gestartet, nachdem der Vorlauf in A und B eine

konstante Größe erreicht hat. Danach liest man die Extinktion in beiden Küvetten gegen Luft so lange ab, bis die Extinktionsabnahme pro Min. in beiden Ansätzen dieselbe ist. Abb. 10 gibt den Verlauf eines Testes mit Einsatz reiner MVS, Abb. 11 einen solchen mit Einsatz eines Leberextraktes wieder.
(Abb. 10 und 11 auf Seite 37!)

Isolierung von Mevalonsäurekinase (38):

1. Toluolautolyse:

600 g frische ungespreste Bäckerhefe (Oberkotzau) werden fein zerkrümelt und im Thermostaten auf 37°C gebracht, sodann werden 36 ml Toluol zugesetzt und der Ansatz 45 Min. bei 37°C belassen. Danach werden 30 ml H₂O zugegeben und der Ansatz weitere 45 Min. unter häufigem Umrühren bei 37°C gehalten. Zur verflüssigten und stark gärenden Hefe werden 500 ml dest. Wasser gegeben, der Ansatz wird auf Zimmertemperatur gebracht und während 3-4 Stunden das pH durch Zusatz von 5 N KOH zwischen pH 7,4 und 7,6 gehalten. Das Autolysat bleibt nun 12-16 Stunden bei Raumtemperatur stehen und wird danach 20 Min. bei 5 000 x g abzentrifugiert. Das Überstehende filtriert man anschließend durch Glaswolle. Man erhält 650 ml eines braunen, etwas trüben Extraktes. Proteingehalt 25 mg/ml.

2. Säurefällung:

Das pH des Extraktes wird nun an der Glaselektrode mit 2 M Essigsäure unter mechanischem Rühren auf pH 5,7 gebracht und das ausgefallene Protein 15 Min. bei 20 000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen.

3. Geladsorption:

Zum Überstand gibt man unter mechanischem Rühren Ca-Phosphatgel (51) im Verhältnis Gel-Trockengewicht : Protein = 0,5. Das Gel soll während 10 Min. zugegeben werden, danach rührt man 10 Min. weiter und zentrifugiert dann 5 Min. bei 5 000 x g ab. Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag mit 100 ml M/10 Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 gründlich eluiert, das Gel erneut abzentrifugiert und nochmals mit 40 ml des gleichen Puffers gewaschen. Die

klaren, schwach bräunlichen Filtrate werden vereinigt, Volumen 172 ml, Proteingehalt 5,8 mg/ml.

4. Ammonsulfatfällung:

Zum Gel-Eluat wird unter mechanischem Rühren langsam fein gemahlenes trockenes Ammonsulfat p.A. bis zu 57 %iger Sättigung gegeben. Der Ansatz bleibt 15 Min. im Eisbad stehen, der Niederschlag wird sodann 10 Min. bei 20 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das ausgefallene Protein in 40 ml M/10 Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 klar gelöst. Vol. 42,5 ml. Proteingehalt 7,9 mg/ml.

5. Hitzschritt:

Die Ammonsulfatfraktion wird in einem Wasserbad von 80°C rasch auf 50-53°C gebracht und dann im Thermostaten 5 Min. lang unter ständigem Umrühren auf 55°C gehalten. Nach raschem Abkühlen im Eis-Kochsalzbad auf 0°C wird 10 Min. bei 20 000 x g zentrifugiert. Das denaturierte Protein wird verworfen, das Überstehende gegen 10 l dest. Wasser 4 Stunden bei 0°C dialysiert. Volumen 39 ml, Proteingehalt 4,0 mg/ml.

6. Ammonsulfatfraktionierung:

Zum Dialysat wird wie unter 4. Ammonsulfat bis zu 50%iger Sättigung gegeben. Der Ansatz bleibt 10 Min. im Eisbad stehen und wird dann 10 Min. lang bei 20 000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen, und zum Überstand weiter Ammonsulfat bis zur 60%igen Sättigung gegeben. Man läßt den Ansatz wieder 10 Min. bei 0°C stehen und zentrifugiert dann 15 Min. bei 20 000 x g ab. Der Überstand wird verworfen und das ausgefallene Protein in 5 ml M/10 Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 klar gelöst. Volumen 5,5 ml. Proteingehalt 4 mg/ml.

Der Test des Enzyms erfolgt wie der zur Bestimmung der Mevalonsäure angegebene, allerdings unter Einsatz von 2 µM K-Mevalonat in Küvette A. 1 EE ist diejenige Enzymmenge, die in diesem Test bei einer Temperatur von 25°C in 10 Min. ΔE_{366} von 0,100 hervorruft. Da von rohen Hefeextrakten DPNH sehr rasch oxydiert wird, kann man frühestens nach der Geladsorption

(Schritt 3) den optisch-enzymatischen Test durchführen.

Tabelle 1: Anreicherung der MV-Kinase:

Schritt	Ges. Prot. (mg)	EE	s. A.
Gel-Eluat	996	3690	3,7
AS-Fällung I	336	3190	9,5
Hitzfällung	156	2113	13,0
AS-Fällung II	22	672	31,0

Die Eignung des Testes für die Bestimmung von Mevalonat in Leberextrakten wurde durch Zusatz einer definierten Menge K-Mevalonat zu Leber vor dem Homogenisieren geprüft. Dabei konnte nahezu 100 % der eingesetzten Menge Mevalonat wiedergefunden werden, wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist.

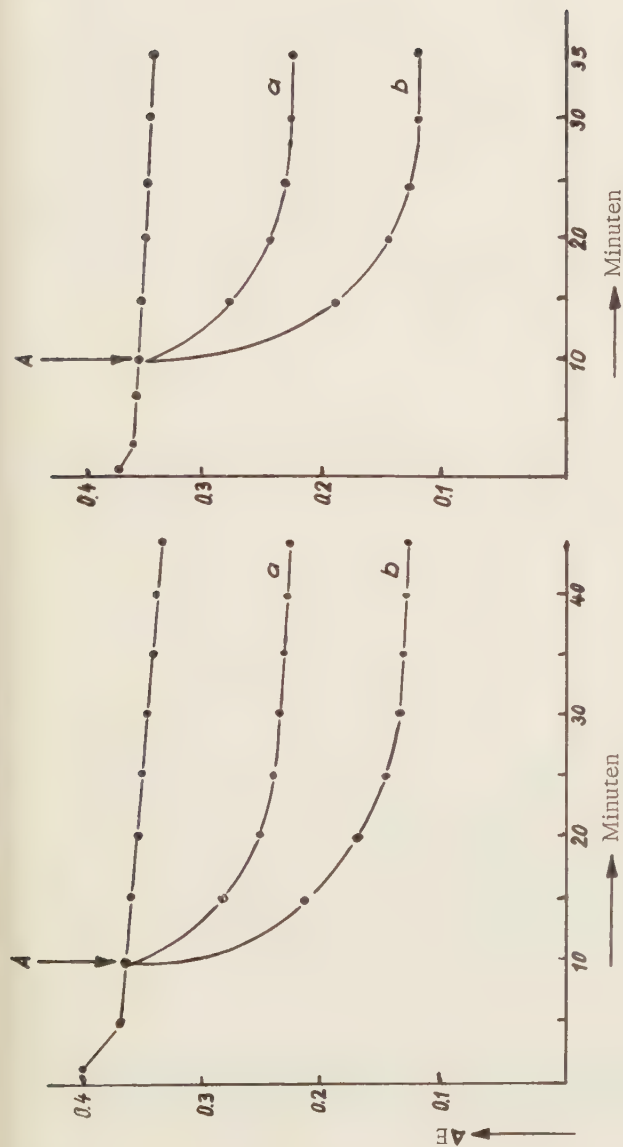
Tabelle 2 : Verhalten zugesetzter Mevalonsäure im MVS-Test:

Mevalonat	Zusatz	berechnet	gefunden	%
179	100	279	272	96
89	100	189	180	95

Alle Werte sind in nMol angegeben.

Versuche, den MVS-Gehalt der Leber mit einer von F. Lynen (63) angegebenen colorimetrischen Methode unter Bildung einer Hydroxamsäure zu messen, schlugen fehl. Die mit dieser Methode erhaltenen Werte lagen fast um das Doppelte über den im enzymatischen Test gefundenen. Wahrscheinlich werden bei der Ätherperforation außer MVS andere Stoffe extrahiert, die ebenfalls mit Hydroxylamin eine Hydroxamsäure bilden oder auf andere Weise die Bestimmung beeinträchtigen.

Abb. 10 und 11:



- a) 0,07 uM MVS
 b) 0,14 uM MVS
 A = Zusatz von 3-4 EE MV-Kinase
 d = 1 cm
 t = 25°C
- a) 0,3 ml Extrakt
 b) 0,6 ml Extrakt
 A = Zusatz von 3-4 EE MV-Kinase
 d = 1 cm
 t = 25°C

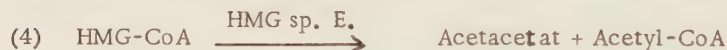
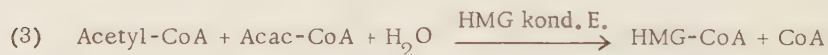
4. Enzymbestimmungen:

a) Herstellen von Organextrakten:

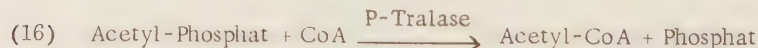
Für die Enzymbestimmungen wurde die im flüssigen Sauerstoff eingefrorene Leber 3 Min. lang mit dem 4-fachen Volumen Periston (Bayer) (11) im Potter-Homogenisator aufgeschlossen. Das Enzym HMG-CoA Desmolase konnte jedoch bei diesem Vorgehen nicht vollständig extrahiert werden, so daß es sich als notwendig erwies, das Potter-Homogenisat unter strenger Kühlung im Eis-Kochsalzbad von -8°C - 10°C 30 Sek. einem zusätzlichen Aufschluß in einem hochtourigen Zerkleinerungsgerät (+) zu unterziehen. Durch anschließen des 10-minütiges Zentrifugieren bei $20\,000 \times g$ ließen sich auf diese Weise vollkommen klare Leberhomogenisate herstellen, die in die entsprechenden Tests eingesetzt wurden.

b) Bestimmung des ASES:

Dem Test liegt eine von F. Lynen (61) angegebene Versuchsanordnung zugrunde. Bestimmt wird die Größe der Acetessigsäurebildung der Leber in 3 Min., wobei Acetyl-CoA und Acetacetyl-CoA als Substrate im Überschuß eingesetzt werden. Die Acetessigsäurebildung erfolgt in 2 Reaktionsschritten an 2 Enzymen (siehe auch Abb. 1, S. 2).



Acetyl-CoA wird im gleichen Ansatz aus Acetyl-Phosphat und CoA-SH mit dem Enzym Phosphotransacetylase dargestellt, Acetacetyl-CoA aus Acetyl-CoA mit β -Ketothiolase, wodurch der Vorteil gegeben ist, CoA-SH nur in katalytischen Mengen einsetzen zu müssen. (Gl. 16, 17).



(+) Verwendet wurde der Ultra Turrax TP 18/2 der Firma Janke und Kunkel, KG, Stauffen i. Breisgau.

Als Quelle für Phosphotransacetylase wurde ein nach (61) dargestellter Extrakt aus Bakt. Clostridium Kluyveri (+), der außerdem β -Ketothiolase in der benötigten Menge enthielt, verwendet. CoA-SH wurde aus einem nach (14,62) hergestellten Quecksilbersalz dargestellt (Herstellung des Bakterienextraktes und Spaltung des Hg-Salzes siehe S. 26).

Die in 30 Min. bei 37°C auf diese Weise gebildete Acetessigsäure wurde colorimetrisch nach Walker (90) bestimmt. (Siehe auch Bestimmung von Acetacetat und Ocalacetat, S. 26).

Durchführung des Testes:

Man pipetiert in 2 spitze Zentrifugengläser A und B hintereinander:

	A	B
0,7 M TRIS-Puffer pH 7,85	0,10 ml	0,10 ml
0,1 M Cystein HCl	0,10 ml	0,10 ml
0,1 M KOH	0,20 ml	0,20 ml
0,2 M Dilithiumacetylphosphat	0,10 ml	-----
CoA (GSH-haltig) 0,3 uM	0,40 ml	-----
Clostridiumextrakt	0,01 ml	0,01 ml
Leberextrakt	0,03 ml	0,03 ml
H ₂ O	-----	0,50 ml
Endvolumen	0,94 ml	0,94 ml

Der Ansatz wird genau 30 Min. bei 37°C inkubiert, dann durch Zugabe von 0,94 ml 7 %iger TCS enteiweißt, und anschließend das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Im klaren Überstehenden erfolgt die Bestimmung des Acetates:

(+) Herrn Prof. Dr. Earl Stadtman bin ich für die Überlassung von Trockenpulver aus Cl. Kluyveri zu großem Dank verpflichtet.

Überstand	0,5 ml
1,4 M Acetatpuffer pH 5,2	0,5 ml
Diazoreagens	3,0 ml

30 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen, dann Zusatz von:

5 N HCl	1,0 ml
Essigsäureäthylester	4,0 ml

Nach dem Ausschütteln mit Essigsäureäthylester erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 436 m μ und einer Schichtdicke von 2 cm. Als Leerwert diente die in Glas B entwickelte Extinktion. Eine EE ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter den Testbedingungen 1 nM Acetacetat bildet. Die spezifische Aktivität wird angegeben in EE pro mg Protein, letzteres nach der Biuret-methode bestimmt (5).

Darstellung von CoA aus Quecksilbersalz (13, 57):

2,28 g Hg-Salz wurde in 25 ml H₂O suspendiert und dann 30 Min. unter Eiskühlung mit H₂S durchströmt. Der dabei entstehende schwarze Niederschlag aus Quecksilbersulfid wurde 10 Min. bei 3 000 x g abzentrifugiert, der klare gelbe Überstand enthielt einen großen Teil des freien CoA-SH. Der Niederschlag wurde in 7 ml H₂O resuspendiert und nochmals 5 Min. mit H₂S behandelt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde mit 5 ml H₂O nachgewaschen und die Filtrate vereinigt. Das in ihnen gelöste H₂S wurde während 30 Min. mit Stickstoff ausgetrieben und danach 700 mg KHCO₃ zugesetzt. Das dabei sich lösende CO₂ wurde durch nochmaliges Durchströmen mit Stickstoff entfernt und das Volumen auf 40 ml gebracht. Das pH der Lösung wurde nun mit KHCO₃ auf pH 6,3 - 6,6 eingestellt. Der Gehalt an CoA-SH betrug durchschnittlich ungefähr 1,2 μ M/ml. Die Gehaltsbestimmung erfolgte nach (78).

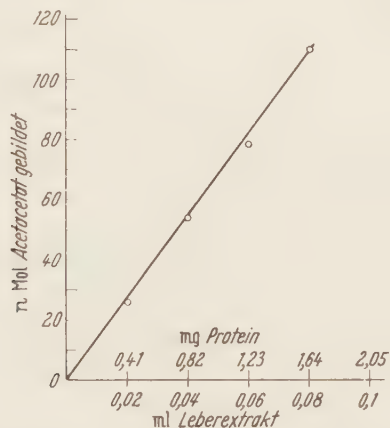
Darstellung des Rohextraktes aus Clostridium Kluuyveri (61):

2 g Trockenpulver von Bakt. Clostridium Kluuyveri wurde in 20 ml Kaliumphosphatpuffer pH 8, M/100 suspendiert und 0,012 ml 50 %iges Na₂S zugesetzt. Dann wurde der Ansatz 4 Std. bei 37°C unter zeitweiligem Rühren inkubiert und anschließend bei 20 000 x g 15 Min. abzentrifugiert. Der Nieder-

schlag wurde einmal mit wenig Puffer nachgewaschen, nochmals abzentrifugiert und die Filtrate vereinigt.

Die Abhängigkeit der Acetacetatbildung von der eingesetzten Enzymmenge ist in Abb. 12 dargestellt. Wie man sieht, verhielt sich die in den eiweißfreien Filtraten bestimmte Menge Acetacetat in einem verhältnismäßig großen Bereich den eingesetzten Mengen Leberextrakt proportional.

Abb. 12: Bestimmung des ASES in rohen Extrakten aus Rattenleber:



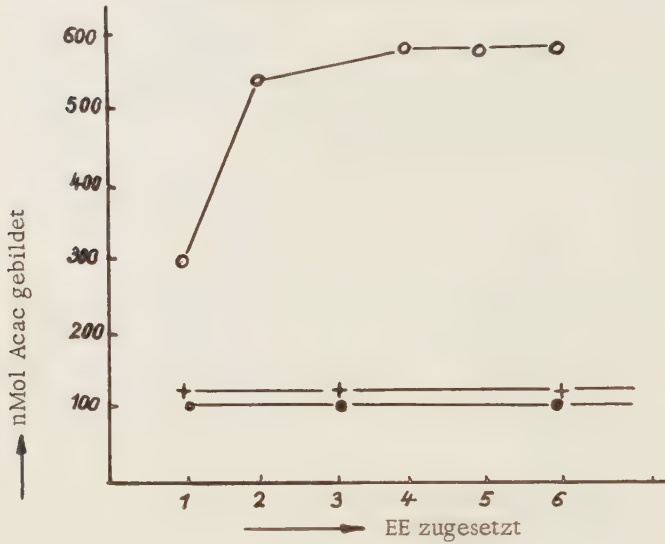
Wie auch von anderer Seite (72) gezeigt wurde, läßt sich in diesem System durch Zusatz von aus Rinderleber angereicherter HMG-CoA Desmolase (61) keine weitere Steigerung der Acetacetatsynthese erreichen, so daß also die gemessene Aktivität mit der des HMG-CoA-kondensierenden Enzyms gleichgesetzt werden kann. Die Bestimmung der Aktivität des HMG-CoA-spaltenden Enzyms kann durch Zusatz von ausreichenden Mengen HMG-CoA-kondensierenden Enzyms aus Hefe erreicht werden. Abb. 13 zeigt die Verhältnisse bei Zusatz der beiden Enzyme.

HMG-CoA-kondensierendes Enzym wurde nach (61) aus Hefe angereichert. Der Anreicherungsang und die Ausbeute ist in Tabelle 13 dargestellt.

c) Bestimmung der HMG-CoA Reduktase:

Die Bestimmung der Aktivität der HMG-CoA Reduktase in rohen Leberextrakten gelang durch die Bestimmung der von ihr nach Gl. 5 gebildeten Mevalonsäure.

Abb. 13: Bestimmung der HMG-CoA Desmolase und des HMG-CoA-kondensierenden Enzyms:



1 mg Leberprotein ohne Zusatz

+ Zusatz von HMG-CoA Desmolase

o Zusatz von HMG-CoA-kondensierendem Enzym

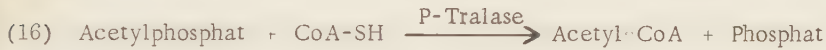
Tabelle 13: Anreicherungsang zur Darstellung des HMG-CoA-kondensierenden Enzyms:

Schritt	Ges. Prot. (mg)	EE	s. A.	Anreicherung
Autolysat	6250	5010	0,84	
Aluminiumgeleluat	590	1415	2,4	2,86-fach
AS-Fällung 50-70 %	201	825	4,1	4,9 -fach
Acetonfällung 0-50%	70	422	6,04	7,2 -fach



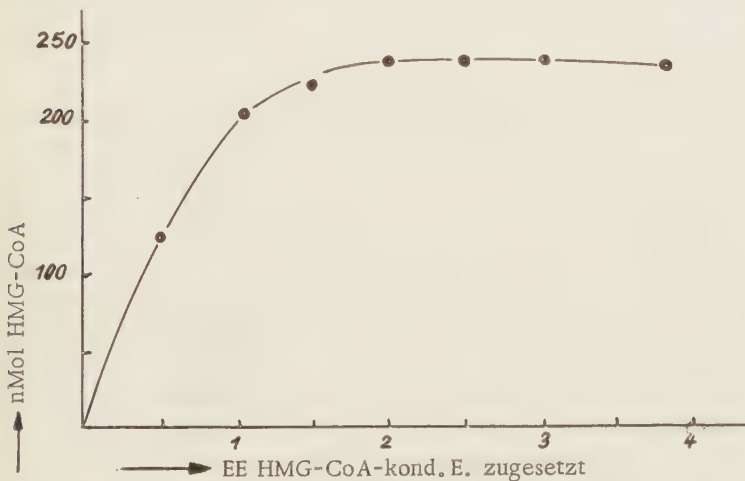
Zur Bereitstellung des für die Reaktion benötigten HMG-CoA und TPNH wurde die Koppelung an 2 Hilfssysteme verwendet:

HMG-CoA wurde aus Acetyl-Phosphat und CoA-SH mit Phosphotransacetylase, β -Ketothiolase (beide im Extrakt aus *Cl. kluyveri* enthalten) und HMG-CoA-kondensierendem Enzym aus Hefe (61) nach den Gleichungen 16, 17, 3 gebildet.



Um die erforderliche Menge an HMG-CoA-kondensierendem Enzym zu ermitteln, wurde das Ausmaß der HMG-CoA Bildung bei Einsatz steigender Mengen HMG-CoA-kondensierendem Enzym untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 14 dargestellt. Beim Reduktasetest wurde darauf geachtet, daß das kondensierende Enzym stets im Überschuß (3-4 EE) vorlag.

Abb. 14: HMG-CoA Bildung im Reduktasetest (Stufe 1):





Die unter Mitwirkung der beiden Hilfssysteme durch das Enzym HMG-CoA Reduktase gebildete Mevalonsäure wurde nach Enteiweissen des Bestimmungsansatzes durch mindestens 5-stündiges Perforieren mit peroxydfreiem Äther extrahiert und nach dem Abziehen des Äthers im Vakuum und Einstellen des pH des Extraktes auf 7,5 mit MV-Kinase und ATP durch Koppelung an das Hilfssystem aus PEP, PK, LDH und DPNH bestimmt, wie es schon auf S. zur Bestimmung des Mevalonsäuregehaltes der Leber beschrieben wurde.

Da der Extrakt aus Cl. Kluveri einen recht beträchtlichen Gehalt an HMG-CoA Reduktase zeigte, und deshalb sehr hohe Leerwerte auftraten, erwies es sich als notwendig, die Mevalonsäurebildung in 2 Stufen ablaufen zu lassen. In der ersten Stufe wurde in dem oben beschriebenen System aus Acetyl-Phosphat und CoA-SH während einer 45 Min. dauernden Inkubation bei 37°C HMG-CoA gebildet. Durch anschließendes Erhitzen 3 Min. lang im siedenden Wasserbad wurde der Ansatz enteweißt und dann nach ausreichender Abkühlung das TPNH-liefernde System und der rohe Leberextrakt zugesetzt (Stufe 2). Eine teilweise Ausschaltung des Mg^{++} -abhängigen HMG-CoA-spaltenden Enzyms konnte durch Zusatz von ÄDTA erreicht werden. eine weitere Hemmung desselben Enzyms durch Acetacetat war zwar im rohen Leberextrakt gefunden worden, konnte aber unter Einsatz gereinigter Enzympräparate nicht mehr reproduziert werden.

Durchführung des Testes:

In 2 Zentrifugengläser A und B pippetiert man nacheinander:

Stufe 1:	A	B
1,0 M TRIS-Puffer pH 7,4	0,10 ml	0,10 ml
0,1 M Cystein HCl	0,10 ml	0,10 ml
0,1 M KOH	0,20 ml	0,20 ml
0,2 M Dilithiumacetylphosphat	0,10 ml	0,10 ml
CoA (GSH-haltig) 0,3 uM	0,40 ml	0,40 ml
Clostridiumextrakt	0,01 ml	0,01 ml
HMG-CoA-kond. E. (3-4 EE)	0,10 ml	0,10 ml
45 Min. bei 37°C inkubieren. 3 Min. bei 100°C ente-		
weissen.	1,01 ml	1,01 ml

	A	B
	1,01 ml	1,01 ml
Stufe 2:		
1,0 M ÄDTA	0,02 ml	0,02 ml
0,05 M Acetacetat	0,02 ml	0,02 ml
0,1 M Gl-6-P	0,10 ml	0,10 ml
0,02 M TPN ⁺	0,05 ml	0,05 ml
G-6-PDH 0,04 mg	0,03 ml	0,03 ml
Leberextrakt	0,06 ml	-----
Leberextrakt-Kochsaft	-----	0,06 ml
Endvolumen	1,29 ml	1,29 ml
30 Min. bei 37°C inkubieren.		
PCS 38,5 %ig	0,12 ml	0,12 ml

Der gesamte enteiweißte Ansatz wird nun mindestens 5 Stunden mit 25 ml peroxydfreiem Äther extrahiert. Die Weiterverarbeitung und die Bestimmung der Mevalonsäure erfolgt wie auf S. 32 beschrieben. Eine EE ist definiert als diejenige Enzymmenge, die unter den Testbedingungen 1 nM Mevalonsäure bildet. Die spezifische Aktivität wird angegeben in EE pro mg Protein (5).

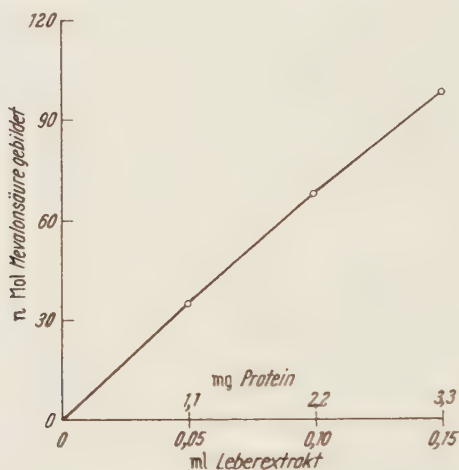
Die Menge der aus diesem Ansatz extrahierten Mevalonsäure verhielt sich in einem weiten Bereich proportional zum Einsatz von Leberextrakt, wie aus Abb. 15 ersichtlich ist.

Eine weitere Kontrolle des Testes ergab sich aus der zusätzlichen Anwendung einer colorimetrischen Mevalonsäurebestimmung (63). Sie beruht auf der Bildung einer Hydroxamsäure aus Mevalonsäurelaktone und Hydroxylamin, die mit FeCl₃ einen blauen Farbkomplex (60) liefert.

Durchführung des Testes:

Die 0,2 - 4,0 uM Mevalonat enthaltende Probe wird mit H₂O auf 0,9 ml verdünnt, mit 0,1 ml 12 N H₂SO₄ versetzt und anschließend 5 Min. bei 37°C in-

Abb. 15: Bestimmung von HMG-CoA Reduktase in rohen Leberextrakten:



kubiert. Darauf wird trockenes Na_2SO_4 zugegeben, bis ein fester Kristallbrei entsteht, und dieser 4mal intensiv mit 1,5 ml peroxydfreiem Äther verrieben. Nach Vereinigung der Extrakte und Abziehen des Äthers im Vakuum wird der das Lakton enthaltende Rückstand in 0,2 ml H_2O aufgenommen und 0,8 ml 2 M mit KOH neutralisiertes Hydroxylamin zugesetzt. Anschließend wird der Ansatz 45 Min. bei 37°C inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgt durch Zusatz von 1,3 ml FeCl_3 -Lösung. Unmittelbar darauf wird die Extinktion bei der Wellenlänge 546 m μ und der Schichtdicke 1 cm gemessen.

Zusammensetzung des FeCl_3 -Reagens:

12 % TCE	20 ml
5 % FeCl_3 in 0,1 N HCl	20 ml
3 N HCl	20 ml

Die mit dieser Methode gefundenen Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit den auf optisch-enzymatischem Wege gewonnenen (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Bestimmung der Mevalonsäurebildung im Reduktasetest (nMol Mevalonsäure/mg Protein)

Enzymatisch bestimmt mit MV-Kinase (38)	Colorimetrisch bestimmt als Hydroxamsäure (63)
26,4	25,3

In Tabelle 15 ist der Testverlauf bei Weglassung bzw. Änderung einiger Testkomponenten dargestellt. Es erscheint demnach gleichgültig, ob man HMG-CoA enzymatisch bereitet oder als solches in den Test einsetzt. Die Tabelle zeigt außerdem den verhältnismäßig hohen MV-Reduktasegehalt des Cl. Kluveriextraktes, so daß die beträchtlichen Leerwerte verständlich werden, die entstehen, wenn man den Test in einer Stufe durchlaufen läßt.

Reagentien:

ATP, ADP, DPN, TPN, G-3-P, sowie die Enzyme G-6-PDH, PK und LDH wurden von der Firma Böhringer, Mannheim, bezogen. MDH wurde aus Schweineherz (2), MV-Kinase aus Hefe (38), HMG-CoA-kondensierendes Enzym ebenfalls aus Hefe (61) und HMG-CoA Desmolase aus Rinderleber (61) angereichert. HMG-CoA wurde aus CoA und HMG-Anhydrid dargestellt (41).

Acetyl-Phosphat stand in Form des Dilithiumsalzes (1) zur Verfügung, D, L-Mevalonsäure und H₂-CoA wurde vom Max-Planck-Institut für Zellchemie, München (2), erhalten. Oxalessigsäure war ein Präparat der Firma Th. Schuchard, München.

-
- (1) Herrn Privatdozent Dr. W. Lamprecht, Technische Hochschule, München und
 - (2) Herrn Prof. Dr. F. Lynen, MPI für Zellchemie, München, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung der genannten Substanzen meinen besten Dank sagen.

Tabelle 15. Die Komponenten des HMG-CoA Reduktase-
testes:

Versuchsansatz	nMol Mevalonsäure gebildet
Komplett ^{a)}	83,5
Ohne Acetyl-Phosphat ^{b)}	0,00
Ohne Clostr.-Extrakt ^{c)}	1,5
Ohne HMG-CoA-kond. E. ^{d), e)}	18,6
Ohne CoA-SH ^{f)}	3,3
Ohne Leberextrakt	2,4
0,15 nM HMG-CoA anstelle von b), c), d), f)	88,0
dto, aber Clostr.-Extrakt anstelle Leberextrakt	56,0
dto, aber HMG-CoA-kond. E. anstatt Leberextrakt	0,00

a) Zusammensetzung der Testmischung vgl. S.

b) c), d), f) wurden in Stufe 1 des Testes weggelassen.

e) angereichert aus Hefe (61).

Statistische Berechnung:

Die Standardabweichung s wurde unter Zugrundelegung der Streuung s^2 errechnet. Dabei ist

$$s^2 = \frac{(S(x^2) - \bar{X}S(x))}{N-1}$$

$S(x^2)$ = Summe der ins Quadrat erhobenen Einzelwerte

$\bar{X}$ = Arithmetischer Mittelwert

$$s = \sqrt{s^2}$$

$S(x)$ = Summe der Einzelwerte

N = Anzahl der Einzelwerte

Die statistische Berechnung der Signifikanz erfolgte nach der t-Verteilung. Diese wird mit Hilfe der Standardabweichung der Mittelwertsdifferenz zweier Reihen errechnet:

$$s_{x,x'}^2 = \frac{S(x^2) - X S(x) + S(x'^2) - \bar{X}' S(x')}{N + N' - 2}$$

$$s_D = \sqrt{\frac{S_{x,x'}^2}{N} - \frac{S_{x,x'}^2}{N'}}$$

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{X}'}{s_D}$$

Die Wahrscheinlichkeit P wurde den "Statistical Tabelles for Agricultural, Biological and Medical Research" von R. A. Fisher und F. Yates, Edinburg: Oliver and Boyd, 1953, entnommen. (Vgl. auch "Wissenschaftliche Tabellen Geigy", S. 26).

ZUSAMMENFASSUNG:

1. In der Leber normaler, hungernder und diabetischer Ratten wurden folgende Substrate und Enzyme bestimmt:
Acetacetat, Oxalacetat, Mevalonat, die Aktivität des Acetessigsäure-synthetisierenden Enzymsystems, des HMG-CoA-spaltenden Enzyms und der HMG-CoA Reduktase.
2. In Übereinstimmung mit anderen Autoren konnte gezeigt werden, daß ein verminderter Oxalacetatgehalt der Leber als ursächlicher Faktor für die Entstehung der Ketose nicht verantwortlich ist.
3. Die Aktivität des Acetessigsäure-synthetisierenden Enzymsystems und HMG-CoA-spaltenden Enzyms erfährt beim Diabetes, nicht aber bei der Hungerketose, eine beträchtliche Steigerung.
4. Bei der Hungerketose tritt ein völliger Schwund der HMG-CoA Reduktase und des Mevalonsäuregehaltes der Leber auf, während bei der diabetischen Ketose keinerlei Veränderung des Enzyms gegenüber der Norm feststellbar ist.
5. Die vorliegenden Ergebnisse werden in ihrer Bedeutung für den Mechanismus der Ketonkörper bzw. Cholesterinbildung und für die biochemische Abgrenzung der diabetischen und der durch Hungern ausgelösten Ketose diskutiert.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. O. Wieland, II. Medizinische Klinik der Universität München, für die Überlassung des Themas und für die unermüdliche Unterstützung, mit der er das Zustandekommen der Arbeit sehr wesentlich förderte, meinen besten Dank sagen.

Ebenso möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, für die großzügige Gewährung einer finanziellen Unterstützung danken, die mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit ermöglicht hat.

LITERATUR.

1. Arnold, V.: Zentralblatt für innere Medizin 21, 417 (1900)
2. Athenstädt, R.: Diplomarbeit. Universität München 1956
3. Bachhawat, B.K., Robinson, W.G., und Coon, M.J.: J. Biol. Chem. 216, 727 (1955)
4. Beatty, C.H., und West, E.S.: J. Biol. Chem. 215, 661 (1955)
5. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., und Pfeleiderer, G.: Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
6. Bloch, K., Clark, C., Harary, J.: J. Biol. Chem. 211, 687 (1954)
7. v.Brand, V., und Helmreich, E.: Bioch. Z. 328, 146 (1956)
8. Breusch, F.L.: Advanc. Enzymol. 8, 408 (1948)
9. Bucher, N.L.R., Overath, P., and Lynen, F.: Fed.Proc. 18, 20 (1959)
10. Bücher, Th.: unveröffentlicht, vgl. auch Informationen der Biochemica Boehringer Enzymatische Bestimmung von ADP und AMP.
11. Bücher, Th.: Privatmitteilung
12. Bühring, H., und Kühnau, J.: Klin. Wochenschrift, 14, 694 (1960)
13. Copenhaver, J.H., Shipley, E.G., and Meyer, R.K.: Arch. Biochem. 34, 360 (1951)

14. Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure, S. 64, Stuttgart: Ferdinand Enke-Verlag, 1959
15. Siehe Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure, S. 267, Stuttgart, Ferdinand Enke-Verlag, 1959
16. Dekker, E.E., Schlesinger, M.J., and Coon, M.J.:
J. Biol. Chem. 233, 434 (1958)
17. Edson, N.L.: Biochem. J. 29, 2082 (1935)
18. Eggerer, H., Stadtmann, E.R., Overath, P.; und Lynen, F.:
Biochem. Z. 333, 1 (1960)
19. Ellwood, J.C., and van Bruggen, J.T.:
J. Biol. Chem. 235, 568 (1960)
20. Ellwood, J.C., Marcó, A., and van Bruggen, J.T.:
J. Biol. Chem. 235, 573 (1960)
21. Embden, G., und Marx, H.: Hofmeisters Beitrag zur physiologischen Pathologie 11, 318 (1908)
22. Embden, G., und Loeb, A.: Z.f.physiol. Chemie 88, 246 (1913)
23. Fasella, P., Baglioni, C., Turano, C., and Siliprandi, N., Lancet: 7030, 1097 (1958)
24. Felts, J.M., Chaikoff, I.L., and Osborn, M.J.:
J. Biol. Chem. 191, 683 (1951)
25. Ferguson, J.J. jr., Durr, I.F., and Rudney, H.:
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 45, 499 (1959)
26. Flaschenträger, B., und Lehnartz, E.:
Physiologische Chemie 2a, S. 828, Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1954

27. Flavin, M., Ortitz, P.J., and Ochoa, S.:
Nature 176, 823 (1955)
28. Frank, H., und Kirberger, E.:
Bioch. Z. 320, 359 (1950) vgl. auch Anleitungen für das Photometer Eppendorf: Bestimmung der wahren Glukose
29. Friedberg, F., Adler, J., and Lardy, H. A.:
J. Biol. Chem. 219, 943 (1956)
30. Friedmann, E.: Bioch. Z. 55, 436 (1913)
31. Geelmuyden, H.C.: Z.f.physiol. Chemie 23, 431 (1897)
32. Gerhard, C.: Wiener Med. Presse 6, 672 (1865)
33. Glock, G.E., and McLean, P.:
Bioch. J. 61, 397 (1955)
34. Glock, G.E., and McLean, P.:
Bioch. J. 61, 381 (1955)
35. Glock, G.E., and McLean, P.:
Bioch, J. 61, 388 (1955)
36. Gomori, G.: .. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 68, 354
(1948) Methods in Enzymology Band 1, S. 144,
New York: Academic Press 1955
37. Haft, D.E., and Miller, L.L.:
The Am. J. of Physiol. 192, 33 (1958)
38. Henning, U.: persönliche Mitteilung
39. Henning, U., Kessel, J., und Lynen, F.:
IV. Internat. Kongr.f.Biochemie, Zusammenfassungen, S. 47, Wien 1958

40. Henning, U.: Deutsche Med. Wochenschrift 15, 760 (1959)
41. Hilz, H., Knappe, J., Ringelmann, E., und Lynen, F.: Bioch. Z. 329, 476 (1958)
42. Hohorst, H.J.: Bioch. Z. 328, 509 (1957)
43. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., und Bücher, Th.: Bioch. Z. 332, 18 (1959)
44. Holzer, H., Goldschmid, S., Lamprecht, W., und Helmreich, E.: Z.f.physiol. Chemie 297, 1 (1954)
45. Vgl. Holzer, H.: Kinetik und Thermodynamik enzymatischer Reaktionen in lebenden Zellen und Geweben, Ergebnisse der med. Grundlagenforschung, Herausgegeben von K.Fr.Bauer, Stuttgart, Georg Thieme-Verlag 1956
46. Hotta, S., and Chaikoff, J.C.: J. Biol. Chem. 198, 895 (1952)
47. Kalnitsky, G., and Tapley, D.F.: Bioch. J. 70, 28 (1958)
48. Katz, J., and Chaikoff, J.C.: J. Am.Chem.Soc. 77, 2659 (1955)
49. Keilin, D., and Hartree, E.F.: Bioch. J. 39, 293 (1945) Genaue Vorschrift vgl. Informationen der Biochemica Boehringer: Enzymatische Bestimmung der Glucose.
50. Übersicht vgl. Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L.: in McElroy, W.D., and Glass, B.: Phosphorous Metabolism 2, S.235, Baltimore 1952

51. Kemke, M.: J. ges. Physiol. 35, 340 (1952)
52. Klebanoff, F.J., and Greenbaum, A.L.:
J. Endocr. 11, 314 (1954)
53. Knappe, J., Ringelmann, E., and Lynen, F.:
Bioch. Z. 332, 195 (1959)
54. Knappe, J.: Diplomarbeit. Universität München 1956
55. Krebs, H.A.: Harvey Lect. S. 165 (1948-1949)
56. Lamprecht, W., und Trautschold, I.:
Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chemie 311,
245 (1958)
57. Langdon, R.G., and Bloch, K.J.:
J. Biol. Chem. 200, 129 (1953)
58. Lehninger, A.L.: J. Biol. Chem. 164, 291 (1946)
59. Leuthard, F.: Lehrbuch der physiol. Chemie, S. 363,
Berlin, Walter de Gruyter Verlag 1959
60. Lipman, F., and Tuttle, C.:
J. Biol. Chem. 159, 21 (1945)
61. Lynen, F., Henning, U., Bublitz, C., Sörbo, B., und Kröplin-
Rueff, L.: Biochem. Z. 330, 269 (1958)
62. Lynen, F., Lerch, I., und Rueff, L.:
Unveröffentlicht, vgl. auch (14), S. 64
63. Lynen, F., und Grassl, M.:
Z. physiol. Chem. 313, 291 (1958)
64. Lynen, F., Wessely, L., Wieland, O., und Rueff, L.:
Angew. Chem. 64, 687 (1952)

65. Lynen, F.: Angew. Chemie 67, 463 (1955)
66. Lynen, F., Reichert, E., und Rueff, L.:
Liebigs Annalen 578, 1 (1951)
67. Man, E.B., and Gildea, E.F.:
J. cli. Invest. 15, 203 (1936)
68. Mann, G.V., and White, H. S.:
Metabolism 2, 47 (1953)
69. Matschinsky, F.: Dissertation, Universität München, 1958
70. Ochoa, S., Mehler, A., und Kornberg, A.:
J. Biol. Chem. 167, 871 (1947)
71. Ochoa, S.: Adv. Enzymology 18, 183 (1954)
72. Overath, P.: Diplomarbeit, Universität München 1960
73. Petters, W.: Prager Vierteljahresschrift f.prakt. Heil-
kunde 55, 81 (1857)
74. Popjäck, G.: Arch. Biochem. Biophys. 48, 102
(1954)
75. Potter, V.R.: Methods in Enzymology 1, S. 10, New
York, Acad. Press 1955
76. Siperstein, M.D., and Fagan, V.M.:
J. of Clin. Invest. 37, 1196 (1958)
77. Shaw, W.V., and Tapley, D.F.:
Bioch. Biophys. Acta 30, 426 (1958)
78. Stadtman, E.R., Novelli, G.D., and Lukens, E.D.W.:
J. Biol. Chem. 191, 365 (1951)

79. Stern, J.R., Coon, M.J., and Del Campillo, A.:
Nature 171, 28 (1953)
80. Stern, J.R., and Miller, G.E.:
Biochim. Biophys. Acta 35, 576 (1959)
81. Stern, J.R., Drummond, G.J., Coon, M.J., and Del Campillo, A.:
J. Biol. Chem. 235, 313 (1960)
82. Stern, J.R., Coon, M.J., and Del Campillo, A.:
J. Am. Chem. Soc. 75, 1517 (1953)
83. Stern, J.R., Ochoa, S., and Lynen, F.:
J. Biol. Chem. 198, 313 (1952)
84. Stern, J.R., Shapiro, B., Stadtman, E.R., and Ochoa, S.:
J. Biol. Chem. 193, 703 (1951)
85. Stetten, D. jr., and Boxer, G.E.:
J. Biol. Chem. 156, 271 (1944)
86. Stetten, D. jr., and Klein, B.:
J. Biol. Chem. 159, 593 (1945)
87. Tavormina, P.A., Gibbs, M.H., and Huff, J. W.:
J. Am. Chem. Soc. 78, 4498 (1956)
88. Tchen, T.T.: IV. Internat. Kongr. f. Biochemie, Zusammenfassungen, S. 47, Wien 1958
89. Utter, M.F., and Kurahashi, K.:
J. Biol. Chem. 207, 821 (1954)
90. Walker, P.G.: Bioch. J. 58, 699 (1954)
91. Warburg, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Berlin, Verlag W. Sängner 1948
92. Weiss, L.: Dissertation. München 1961.

93. West, E. S., and Todd, W. R.:
Textbook of Biochemistry, S. 993,
1955.
94. Wieland, O.:
Klin. Wochenschr. 32, 385 (1954)
95. Wieland, O.:
Mü. Med. Wochenschr. 101, 501
(1959)
96. Wieland, O., Löffler, G., Weiss, L., und Neufeldt, I.:
Bioch. Z. 333, 10 (1960)
97. Wieland, O., Reinwein, D., und Lynen, F.:
Biochem. Problems of Lipids, S. 155,
London, Butterworths Scient. Publ.
1956.
98. Wieland, O., und Neufeldt, I.:
Unveröffentlicht
99. Wieland, O.:
8. Kolloquium der Gesellschaft für
physiol. Chemie, Mosbach, Baden.
1957.
100. Wieland, O.:
persönliche Mitteilung.
101. Wolf, D. E., Hofmann, C. H., Aldrich, P. E., Skeggs, H. R.,
Wright, L. D., and Folkers, K.:
J. Am. Chem. Soc. 78, 4499 (1956)
102. Wong, R. K. L., and van Bruggen, J. T.:
J. Biol. Chem. 235, 30 (1960)
103. Wong, R. K. L., and van Bruggen, J. T.:
J. Biol. Chem. 235, 26 (1960)
104. Wood, H. G., and Werkman, H. C.:
Bioch. J. 34, 129 (1940)

LEBENS LAUF

Am 9. Nov. 1935 wurde ich, Georg Löffler, als Sohn des Facharztes für Chirurgie, Dr. med. Wilhelm Löffler, und seiner Frau Martina, geb. Knabenhans, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1947 in das Lyceum Alpinum in Zuoz, Schweiz, ein. Von 1949 bis 1954 besuchte ich das Theresiengymnasium in München, wo ich auch am 13. Juli 1954 die Reifeprüfung ablegte. Im gleichen Jahr begann ich an der Universität München das Studium der Medizin. Am 7. März 1957 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung. Am 2. April 1958 heiratete ich meine Frau Ilse, geb. Burr. Nach 7 klinischen Semestern habe ich mich im Sommer 1960 zum medizinischen Staatsexamen gemeldet. Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand in den Jahren 1957 bis 1959.

